





# Single-Molecule Techniques
# A Laboratory Manual

# 单分子技术实验指南

〔美〕P.R. 塞尔文
〔韩〕河泽集 主编
罗建红 主译

科学出版社

(Q-2372.31)

## 生命科学实验指南系列 · 典藏版



| | |
|---|---|
| 图解微生物实验指南 | 精编人类遗传学实验指南 |
| 免疫学技术及其应用 | 单分子技术实验指南 |
| 生物衰老：研究方法与实验方案 | 现代蛋白质工程实验指南 |
| 精编细胞生物学实验指南 | 活细胞成像（原书第二版） |
| 植物蛋白质组学实验指南 | 遗传变异分析实验指南 |
| 蛋白质纯化指南（原书第二版） | 表皮细胞实验指南 |
| 环境基因组学实验指南 | 分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册） |
| 实验动物血液生理生化参考手册 | 精编分子生物学实验指南（原书第五版） |
| 生理学实验指南 | 现代神经科学研究技术 |
| 精编免疫学实验指南 | 生命科学实验设计指南 |
| 酵母遗传学方法实验指南 | 现代生物化学与分子生物学仪器与设备 |
| 人干细胞培养 | 分子细胞遗传学——技术和应用 |
| 抗体制备及使用实验指南 | 精编蛋白质科学实验指南 |
| 病毒的电子显微学研究 | 实验细胞资源的描述标准与管理规范 |
| 植物生物学与生态学实验 | 实验动物设施运行管理指南 |
| 神经生物学实验原理与技术 | 元基因组学：方法和步骤（影印版） |
| DNA微阵列实验指南 | 现代工业微生物学实验技术 |
| 基因转移：DNA和RNA的转运与表达 | 真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版） |
| 生物实验室管理手册（原书第二版） | 动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版） |



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn



赛拉艾芙
生命科学订阅号



本书彩图请扫码

www.sciencep.com



ISBN 978-7-03-047486-5

定价（全套）：4500.00元

销售分类建议：分子生物技术

生命科学实验指南系列·典藏版

# 单分子技术实验指南

## Single-Molecule Techniques

### A Laboratory Manual

〔美〕P. R. 塞尔文
〔韩〕河泽集 主编
罗建红 主译

科学出版社
北京

图字：01-2008-3026 号

## 内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。



**图书在版编目（CIP）数据**

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

**定价：4500.00 元**

(如有印装质量问题，我社负责调换)

# 中译本序

20世纪90年代后期，由于科学发展的必然以及技术条件的渐臻完备，兴起了以研究活细胞大分子为目的的单分子研究，有人称之为单分子生物学（biology in singulo），它是21世纪生命科学发展的一个重要方向，其前景非常广阔。

《单分子技术实验指南》就是为了满足这一客观需要而出版的，它涵盖了相关的各项技术，是世界范围内第一本较全面介绍单分子技术的技术手册专著。它的特色是：①内容新颖，都是最近几年的实验资料和经验总结；②内容翔实，都是各实验室自己做过的实验资料；③有一定的理论阐述，主要见于各章的概论部分。所以，这本手册将会帮助有关科研人员较快地掌握和运用单分子技术；另外，阅读各章节前面所写的理论引言，对于我们理解单分子行为也有所裨益。

单分子研究对于我国的基础科学，特别是生命科学研究具有重要意义，对于推进我国的科学、技术发展也会有长远、持久的作用。《单分子技术实验指南》中译本的问世，一定会对我国单分子研究的发展起到良好的推动作用。

陈宜张

中国科学院院士

2009年11月17日

# 目　　录

# 第1章 单分子生物学的新时代

**Taekjip Ha**[*,†,‡] **Paul R. Selvin**[*,†]

[*] Department of Physics,[†] Center for Biophysics and Computational Biology, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801;

[‡] Howard Hughes Medical Institute, Urbana, Illinois 61801

由于许多生物学反应过于复杂，用传统的"一锅烩"检测技术难以完全理解。从本质上讲，所有的生物学反应都是通过单个酶、DNA 或 RNA 分子起作用的。单个生物大分子的研究，或称单分子生物学（biology in singulo），能非常清晰并常常令人惊奇地看到生物大分子究竟是如何起作用的。

除了早已建立的生理学核心技术——单通道记录，生命过程的单分子研究是一个新近发展起来的研究领域，整个历史还不到 20 年，近年来得到了蓬勃发展。例如，该领域的论文发表数呈指数增长，约 2.2 年翻一番（Cornish and Ha 2007）。如果这一趋势得以持续，那么 20 年内生物医学的每一篇论文都将包含单分子的数据！但就目前而言，单分子技术仍然还是难以掌握的，而且只有少数研究组获得了该领域研究的资助。我们相信，当单分子技术普及的时候，这种情况就会有所改变。我们希望本实验指南有助于把单分子技术从专家手中交给那些普通的生物医学研究者。

有两类广义的单分子方法，一是荧光成像及其光谱学，二是基于力学的操作和检测。我们将荧光部分又分成离体和在体（即活细胞内）两种。基于力学的单分子技术又分为采用光阱、磁阱、原子力显微镜及纳米孔等几种。

最初单个荧光团的检测是在液氦下通过测量吸收（Moerner and Kador 1989）和荧光（Orrit and Bernard 1990）完成的，后来发展到在室温下完成（Bitzig and Chichester 1993），从而开启了生物学应用的可能性。单分子荧光检测蕴涵了标记生物大分子的哪些信息呢？首先是它的存在和它所在的位置，即定位。通过荧光标记酶或 ATP 分子就能检测出单个酶分子或单个与酶结合的 ATP 分子的存在（第 15 章）。采用二维高斯拟合对单个荧光团（或两个不同颜色的荧光团）的成像进行拟合就可以实现约 1 nm 精度的单个荧光团定位（第 3 章和第 4 章）。其次，单个荧光团的偏振反应可用于推导标记分子或功能域的取向（第 6 章和第 3 章的部分内容）。第三，两个荧光团（分别称为供体和受体）之间的距离可以通过测量两者之间的荧光共振能量转移（FRET）推导得到。两种主要的单分子 FRET 技术，即用全内反射荧光显微镜（TIRFM）对许多分子做平行检测或对弥散分子做共焦检测，将分别在不同的章节中予以介绍（第 2 章和第 5 章）。TIRFM 的检测要求把目标分子定位于表面且不影响其功能。几种表面固定的方法也会在第 20 章及第 2 章、第 3 章和第 21 章的部分内容中加以讨论。

将单分子检测技术扩展到活细胞是个难题，但通过使用以下方法还是可以实现的，即高亮度量子点标记（第 9 章）、多拷贝荧光团（第 3 章、第 8 章和第 10 章）、固相化

检测（第 7 章），及背景荧光的自然衰减（第 11 章）。严格地说，荧光相关光谱学（FCS）并不是单分子技术，这是因为 FCS 的信号是来自数以千计的分子信号的平均，但是检测是在“单分子”浓度下完成的，所以在某个特定的时刻，在检测池中只有一个或几个分子。离体及活细胞在体条件下的 FCS 将在第 12 章中讨论。

光阱（optical trap 或 optical tweezer）（Ashkin et al. 1986）通过高度聚焦的激光微束可以对捕获的颗粒产生作用力和微小位移。第 13 章介绍了主要用于肌球蛋白研究的具有纳米级分辨率的单光阱和双光阱技术。第 14 章介绍了亚纳米级分辨率的双光阱技术。磁阱（magnetic trap 或 magnetic tweezer）（Strick et al. 1996）目前的时空分辨率不如光阱好，但其最大的优点是能产生扭矩并控制 DNA 分子的超螺旋状态（第 16 章）。

原子力显微镜（AFM）主要有两种不同的用途，一是作为成像工具（不在本指南讨论范围），二是作为力的传导装置和感受器（第 17 章）。就力学的测量而言，AFM 不如光阱和磁阱敏感，但是它能荷载的力要大得多，已被证明是研究蛋白质折叠和去折叠的理想方法。最后，纳米孔道可以源自天然蛋白质，也可以是薄膜材料上的人造孔道，通过测量纳米孔道的电流可以用来检测 DNA 和其他大分子在电场驱动下的转运（第 18 章）。

这些单分子技术未来到底会怎样呢？迄今为止，大多数的离体研究仅限于相对简单的系统，仅涉及一个分子或两个分子的相互作用。然而，在细胞内这些分子并不是孤立起作用的。为了研究由多组分构成的更为复杂的分子机器，必须进一步研发能同时检测两个或更多可观察分子的技术，如通过三色 FRET 测量多个分子间的距离（第 2 章和第 5 章），或把基于力学和荧光的方法组合起来使用。第 15 章探讨了在光阱下测量荧光的技术。在离体条件下加入越来越多的纯化组分最终会导致研究意义的缩水，自然也就水到渠成地到了进行活细胞在体研究的时候，因为只有细胞才能提供所有必需的并使研究具有生理学意义的成分。单分子研究的技术前沿可能会走向以下两个极限：①超高精确度的离体单分子研究；②活细胞甚至是生物整体水平的单分子研究。

## 参考文献


Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., and Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11:** 288–290.

Betzig E. and Chichester R.J. 1993. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* **262:** 1422–1425.

Cornish P.V. and Ha T. 2007. A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2:** 53–61.

Moerner W.E. and Kador L. 1989. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* **62:** 2535–2538.

Orrit M. and Bernard J. 1990. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal. *Phys. Rev. Lett.* **65:** 2716–2719.

Strick T.R., Allemand J.F., Bensimon D., Bensimon A., and Croquette V. 1996. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271:** 1835–1837.


（罗建红　译）

# 第 2 章　采用全内反射显微镜的单分子荧光共振能量转移技术

**Chirlmin Joo　Taekjip Ha**

Department of Physics and Howard Hughes Medical Institute, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

## 摘要

单分子（single molecule，sm）荧光检测是研究生物事件的一种非常有力的工具。单分子荧光共振能量转移技术［single molecule Förster（fluorescence）resonance energy transfer，smFRET］也已经被用来研究各种不同的生物系统。本章主要介绍建立在全内反射（total internal reflection，TIR）荧光显微技术基础上的 smFRET。首先介绍染料的选择以及核酸和蛋白质的标记，然后介绍表面的制备和数据的获取，接下来讨论关于数据分析的各种方法，以及物镜型和棱镜型 TIR 显微镜平台的搭建。在本章的最后将提供一系列材料制备以及成像和显微镜技术的实验方案。

## 概述

单分子荧光检测是一项非常强大的技术，它可以避免时间和群体的平均化对生物事件进行探测（Weiss 1999；Cornish and Ha 2007）。smFRET 于 1996 年首次被提出（Ha et al. 1996），然后被世界各地很多实验小组采用，用于研究各种不同的生物系统，包括 DNA、RNA（Zhuang 2005）、蛋白质及一些大的多分子复合物（Ha 2001a，2004；Myong et al. 2006）。本章主要聚焦在建立于全内反射荧光显微技术基础之上的 smFRET（表 2-1 总结了本章主要缩略词或简写的全称）。

**表 2-1　缩略词/简写及其全称**

| 缩略词/简写 | 全称 |
|---|---|
| APD | 雪崩光电二极管（avalanche photodiode） |
| BSA | 牛血清白蛋白（bovine serum albumin） |
| CV | 柱床体积（column volume） |
| Cys | 半胱氨酸（cysteine） |
| DM | 二色镜（dichroic mirror） |
| $E$ | FRET 效率（FRET efficiency） |
| $E_{app}$ | 表观 FRET 效率（apparent FRET efficiency） |
| EMCCD | 电子倍增电荷偶联器件（electron multiplying charge-coupled device） |
| FRET | 荧光共振能量转移（Förster/fluorescence resonance energy transfer） |
| HaMMy | 隐马尔可夫模型（Hidden Markov modeling） |
| $I_A$ | 受体分子的发射强度 |

续表

| 缩略词/简写 | 全称 |
| --- | --- |
| $I_D$ | 供体分子的发射强度 |
| PEG | 聚乙二醇（polyethylene glycol） |
| sm | 单分子（single molecule） |
| TIR | 全内反射（total internal reflection） |
| TMR | 四甲基罗丹明（tetramethylrhodamine） |
| Trolox | 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色酮-2-羧酸（6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromone-2-carboxylic acid） |
| T50 | 含 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）和 50 mmol/L NaCl 的溶液 |

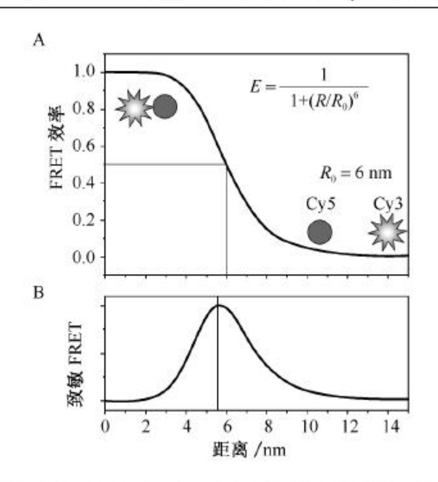



图 2-1 FRET。A. FRET 效率（FRET efficiency）依赖于供体与受体之间的距离。当 Cy3（供体，圆形）与 Cy5（受体，星形）之间的距离为 $R_0$（6 nm）时，Cy3将它一半的能量传递给 Cy5；B. 在 $R_0$ 附近时 FRET 的改变最显著。

FRET 是一个可以测量距离（范围在 30～80Å）的光谱技术（见第 5 章）。供体分子的激发能量通过两个诱导偶极的相互作用传递给受体分子（Förster 1948）。能量传递的效率（$E$）的计算公式如下：

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

式中，$R$ 为供体和受体之间的距离；$R_0$ 为当转移能量为 50%时供体与受体之间的距离（Clegg 1992）。对于 Cy3 和 Cy5 这对比较经典的 smFRET 荧光对来说，$R_0$ 大约是 60 Å。如图 2-1 所示，当供体与受体分子之间的距离改变几埃或几纳米时，$E$ 就可以发生很大的变化。因此，可以通过 FRET 来探测一个生物分子的结构改变或者两个相互作用分子的相对位移（Selvin 2000）。

**插注 1. $R_0$ 的计算**

$R_0$ 的计算公式如下：

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\Phi_D \kappa^2 J(\nu)}{128\pi^5 N_A n^4}$$

式中，$\Phi_D$ 为供体分子的量子产率；$N_A$ 为阿伏伽德罗常数（Avogadro's number）；$n$ 为介质的反射指数；$\kappa^2$ 为取向因子，它的平均值一般是 2/3；$J(\nu)$ 为标准化的供体发射光谱 $f_D(\lambda)$ 和受体吸收光谱 $\varepsilon_A(\lambda)$ 的重叠，计算如下：

$$J(\nu) = \frac{\int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 \mathrm{d}\lambda}{\int f_D(\lambda) \mathrm{d}\lambda}$$

式中，$\varepsilon_A(\lambda)$的单位为 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$，$M^{-1}$为 1000 $cm^3$/mol。计算 $R_0$ 的免费软件可以从 http://www.photochemcad.com 下载，也可以用 Matlab 程序编写计算。

在整体 FRET 测量中，通常很难让生物分子的构象改变同步化，也无法检测到短暂存在的构象体（图 2-2A）。smFRET 则使实时观测单个生物分子的结构改变成为可能（图 2-2B）。它能够确定几种构象的分布，而不是仅仅将这些构象平均化（McKinney et al. 2003；Lee et al. 2005）。它还可以直接观测到整体条件下很少能观察到的短暂存在的一些结构状态（Nahas et al. 2004；McKinney et al. 2005）。因为可以在数据分析时进行后期同步化处理，因此也就避免了在测量过程中同步化的需要（图 2-2C）（Blanchard et al. 2004）。它还可以研究分子之间的异质性（Zhuang et al. 2002；Okumus et al. 2004）。最后一点，但并不等于不重要，单分子水平的直接观察经常可以得到一些基于整体测量本身无法想象或演算出来的结论（Myong et al. 2005；Joo et al. 2006）。

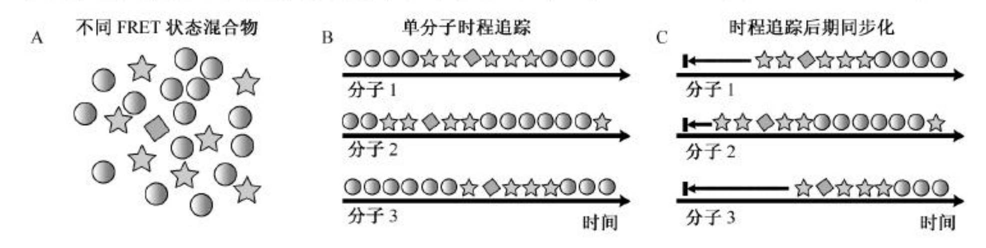



图 2-2 单分子 FRET 研究。A. 整体水平 FRET 检测得到的是众多分子的平均值（mixture of different FRET status）；B. 单分子的时程追踪（single-molecule time trajectory）可以实时观测不同构象的真正的 FRET 状态；C. 观察的事件在数据处理时可以进行后期同步化处理（postsynchronizing time trajectory）。

与其他的单分子技术（如 FIONA、光阱、磁阱等）相比，smFRET 不容易受环境噪声的影响，因为：①它本质上是个比值测量技术，既通过计算两种不同颜色的强度比值来计算 FRET 效率；②它反映了质心系中分子的内在移动。因此可以允许分子之间激发和检测效率的不同。另外，与那些在实验体系中依赖于绝对定位的技术相比，smFRET 实验体系中分子的相对漂移不再是个大问题（见下文，光学平台）。另外，与光阱和磁阱相比，smFRET 更容易从几百个分子中获得数据（如下文的 FRET 柱状图）。因此，可以高度精确地测定生物事件的动力学速度，而且可以筛查出分子之间的内在异质性。不过，有机染料的光物理特性限制了它的时间分辨率，使之局限于毫秒级（ms）（Ha 2001b）。

## 染料的选择

作为单分子研究的理想染料应该尽可能具有以下特点：①光稳定，保证在光漂白之前释放出上百万的光子；②足够亮（高消光系数和量子产率）；③强度波动小，至少在研究的生物事件发生的时程之内保证一定的稳定性；④可激发光和发射光在可见波长范围内；⑤比较小，对宿主细胞干扰少；⑥染料已经商品化并能够交联到生物分子上。

### 最常用的染料

很多种染料（包括 Alexa 和 Atto 系列染料）被用于 smFRET 的研究，其中，Cy3、Cy5 以及四甲基罗丹明（tetramethylrhodamine，TMR）因其优良的光物理学特性，成

为固定分子 FRET 检测的首选染料。Cy3 是我们所测到的最稳定的染料，而对于 Cy5 来说，如果应用含有 Trolox（水溶性维生素 E）的除氧体系也可以大大增加其稳定性（Rasnik et al. 2006）（见成像缓冲液）。TMR 也非常好，它有着与 Cy3 基本相同的光谱，但是消光系数略低。不过，TMR 有可以在两个或三个不同水平之间改变强度的趋势（Buranachai 等未发表数据）。

## 常用的供体和受体荧光对

对于 smFRET 研究来说，一个理想的荧光对应该是：①供体发射光谱和受体吸收光谱有一定的重叠（图 2-3A）；②供体发射光和受体发射光光谱应该尽可能分开，从而尽量减少漏到受体发射区域的供体发射部分，以及减少激光对受体的直接激发数量（图 2-3B）；③供体和受体的发射量子产率相当，以保证供体和受体的反相关强度的改变。目前研究证明 Cy3 和 Cy5 是最普遍应用的 smFRET 供体和受体荧光对，因为：①它们的光谱分离很大（约 100 nm）（图 2-3B）；②它们在无氧环境下非常稳定；③两者的量子产率相当（约 0.25）；以及④它们都已经商品化，并且具有氨基、巯基及其他反应形式。

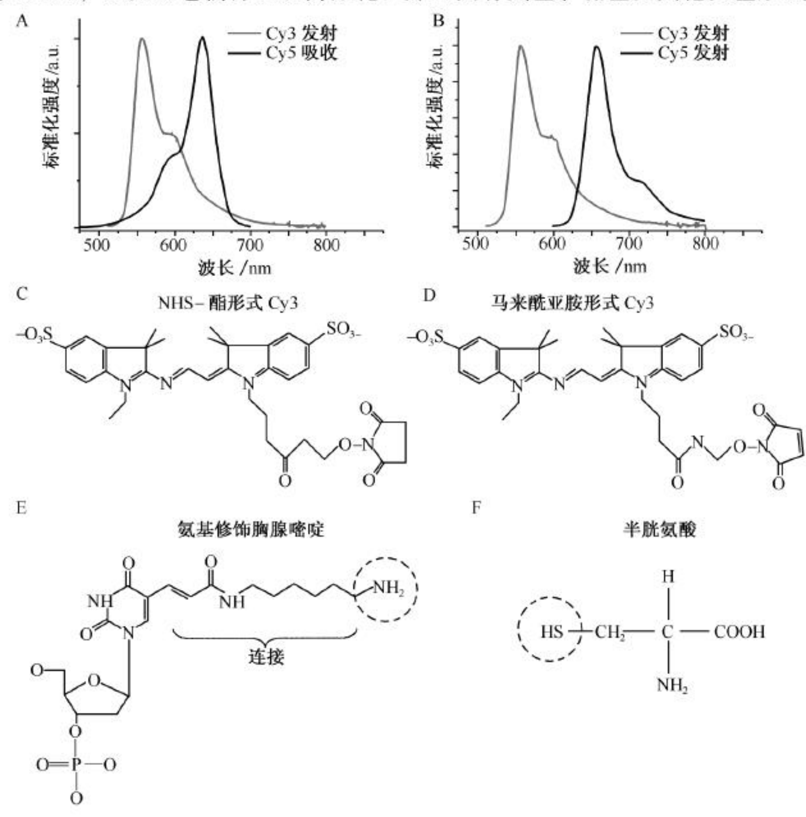



图 2-3 荧光团。A. Cy3（供体）的发射光谱（Cy3 emission）与 Cy5（受体）的吸收光谱（Cy5 absorption）重叠；B. Cy3 和 Cy5 的发射光谱很好地分开；C，D. 分别是 Cy3 染料的 NHS-酯形式（NHS-ester form Cy3）和马来酰亚胺形式（maleimide form Cy3）；E. 通过一个碳连接将一个氨基与胸腺嘧啶的碱基相连，此氨基可以与 NHS-酯相互反应；F. 半胱氨酸的巯基与马来酰亚胺相互反应。

三色 FRET 则根据其特殊的应用有额外的染料选择标准，通常根据三种荧光团的光谱分为下列几种类型：①一个供体/两个受体型（Hohng et al. 2004a）；②两步 FRET 型（Clamme and Deniz 2005）；③两个供体/一个受体型。这些分型不是非常绝对的，也不是彼此排除的，它们在不同的应用中有各自的优缺点（见下文，常规方案：染料分子间的距离）。

## 标记

为了能够进行 smFRET 实验，必须在生物分子的特殊部位标记单个供体、受体和生物素。下面介绍的是短寡核苷酸及含有半胱氨酸的蛋白质的特殊标记方法。需要注意的是，宿主分子的不完全标记将导致 smFRET 检测的相对不敏感。如果供体标记缺失，分子则无法被观察到；如果受体标记缺失，那么这个只含有供体的分子不可能检测到 FRET 的发生。

### DNA（或 RNA）的标记

目前有几家公司提供荧光标记的 DNA（或者 RNA）寡核苷酸。例如，IDT DNA（Intergrated DNA Technologies）能够提供长度在 5～100 核苷酸范围内的 DNA 链的 5′端标记，以及 5～50 核苷酸长度的 DNA 链的 3′端标记。链的中央部位的标记（内部标记）目前也有市售。尽管在寡核苷酸合成的过程中，可以通过亚磷胺化学法（phosphoramidite chemistry）来进行染料的插入，但是这需要打断寡核苷酸的主链，因此有可能破坏其生物功能。因此，我们推荐另外一种方法来进行内部标记，即在寡核苷酸合成过程中，在特定部位添加氨基修饰过的胸腺嘧啶（图 2-3E）。氨基基团与 NHS-酯相互作用可以形成一种染料（图 2-3C），然后通过一个简单的纯化方案一天之内就可以产生纯化的、被标记的 DNA。本章末尾的实验方案 1，详细讨论了 DNA（或 RNA）的标记。

### 蛋白质的标记

目前有多种方法进行蛋白质标记（Schatz 1993；Heyduk 2002）。这里我们主要介绍其中之一。染料的马来酰亚胺形式（图 2-3D）可以与巯基非常特异性地反应，在天然氨基酸中半胱氨酸（图 2-3F）是唯一含有巯基的氨基酸，而且两者反应条件相对温和。因此，如果一个蛋白质只有一个半胱氨酸而且这个半胱氨酸又充分暴露，那么只要把马来酰亚胺染料与蛋白质在一个合适的溶液中混合，就可以很好地标记蛋白质。然而，很多蛋白质都含有多个暴露的半胱氨酸，因此，需要将其他的位点进行点突变（Rasnik et al. 2004）。否则，FRET 的结果反映的是几个 FRET 荧光对的平均值，这样 smFRET 的独特优点就无法展示。如果野生型的蛋白质有很多 Cys 残基，我们不推荐使用这种标记方法。本章末尾的实验方案 2 介绍这种标记方法。一旦标记被成功实施，需要进一步检测蛋白质的功能活性，以防止染料标记可能产生一些假象。

将荧光团标记到理想位置对于成功进行 smFRET 测量是非常关键的。接下来，我们列出了研究蛋白质-DNA（或者蛋白质-RNA）相互作用时设计构建物应该注意的几点。另外，在任何情况下，对于一个蛋白质来说，染料的标记和因固定导致的物理上的限制都有可能影响其活性，因此，smFRET 数据需要与生物集团数据相互验证来判断其真伪。

## 常规方案：染料分子间的距离

当供体与受体之间的距离在 $R_0$ 时，FRET 最敏感（图 2-1B）。因此，通常情况下，放在宿主分子上的两个染料之间的距离在整个构象改变过程中最好都在 $R_0$ 附近（图 2-4A～C，见图版）。对于 DNA 来说，采用内部标记法（见上文，标记 DNA）可以移动荧光团，使之有个最佳的定位（图 2-4A）。当一个荧光团标记 DNA，另一个标记蛋白质时，或者两个荧光团都标记蛋白质时，需要有蛋白质高分辨率的结构信息来确定理想的标记定位（图 2-4B）。

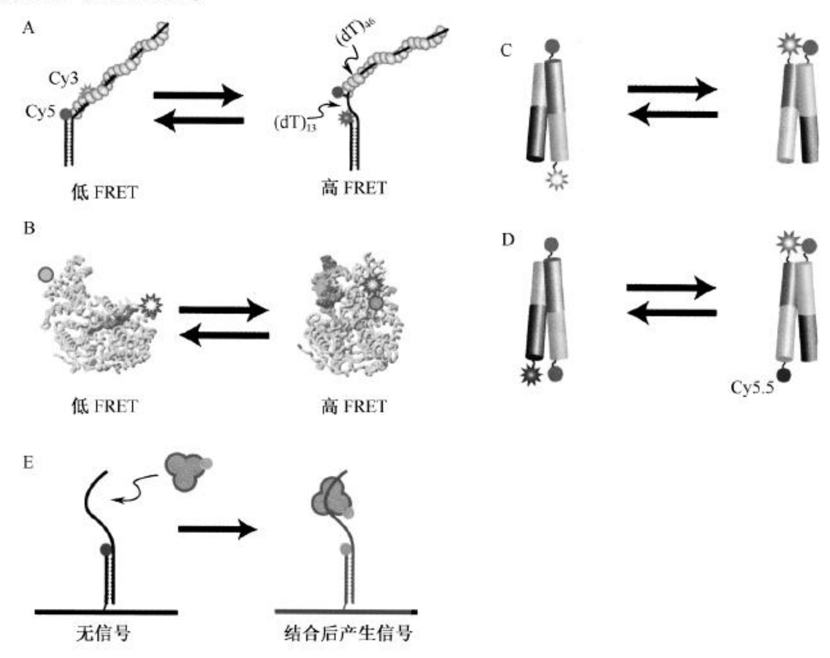



图 2-4 样本标记。A. Cy3 和 Cy5 的放置方式不同，它们的距离不同，长于 $R_0$（左图）或短于 $R_0$（右图）（Joo et al. 2006）。B. 根据蛋白质两种构象的 X 射线晶体结构来选择两个染料的定位。因此，它们被两种不同的 FRET 状态所区分（Myong et al. 2005）。C、D. 用两种不同的 FRET 状态显示一个四通接头的两种不同构象，其中 C 图是一个常用的两色体系，D 图是一个三色体系。在三色体系中，Cy5 和 Cy5.5 在两种构象中都被很好地分开；因此，它们之间的 FRET 可以被忽略（Hohng et al. 2004a）。E. 当一个标记了受体的 DNA 分子被固定时，只有当供体标记的分子与 DNA 结合，才能观察到 FRET 信号。

在三色 FRET 分析中（见图 2-9C），因为 FRET 可以在三个荧光团中任意两个荧光团之间发生，所以如果三个荧光团彼此之间距离非常近，那么，数据会很难分析。例如，如果用两个不同的受体分子（Cy5 和 Cy5.5）来竞争性接受供体分子（Cy3）的能量（见上文，常用的供体和受体荧光对），而这两个受体分子又靠得足够近，那么将很难辨别 Cy5.5 的信号是来自 Cy3 的能量转移，还是来自 Cy3 先转移给 Cy5，再转移给 Cy5.5 的能量转移。在这种情况下，设计构建物时，最好将两个受体分子的距离设计得足够远（远远大于 $R_0$）（图 2-4D）。

### 同时标记供体和受体的 DNA

如果实验中不标记蛋白质，那么 DNA 分子需要固定，并且要同时标记供体和受体荧光团。但是，考虑到产量和成本，将三个修饰（生物素、供体和受体）都施加于一个单链 DNA 上，是非常不切合实际的。所以，一般都是在不同的 DNA 链上进行这些修饰，然后再将两条链退火。例如，如果实验需要一个单链 DNA（ssDNA），通常也是采用一段双链 DNA（dsDNA）（图 2-4A）（Lee et al. 2005；Myong et al. 2005；Joo et al. 2006）。

蛋白质能够改变荧光团的光物理学特性。例如，我们观察到，当附近结合了蛋白质之后，交联在 DNA 上的 Cy3 的荧光强度可以增加。这一般不会给数据分析带来太多的困难，因为我们通常采用 FRET 效率的近似值，可以避免这部分对结果的干扰（Joo et al. 2006）。

关于标记位点选择的其他常规设计原则还包括：①如果蛋白质可以识别 DNA 的一个特殊的化学特征，那么荧光团应该被放在其他的位置；②对于内部标记来说，应该保持 DNA 主链的完整性（见上文，DNA 标记）；③在 DNA 中，与蛋白质相互作用的部分应当远离玻璃表面以避免可能的物理限制。

### 标记的蛋白质

当研究固定在表面的 DNA 与溶液中的蛋白质之间相互作用时，如果两者都需要被标记，那么最好将供体标记到蛋白质上，而将受体标记到 DNA 上，因为在这种情况下，当蛋白质与 DNA 结合时，能够观察到荧光信号的突然增强（图 2-4E；也可以见图 2-7D）。如果相反，蛋白质标记受体而 DNA 标记供体，那么结合将导致低 FRET 状态很难被检测到。同样，如果蛋白质标记受体，那么蛋白质结合后发生的任何额外的 FRET 改变就很难与其他的蛋白质和 DNA 结合导致的 FRET 改变相区别。如果溶液中荧光团浓度太高，那么背景荧光很可能掩盖掉单分子信号。特别是当供体浓度大于 2 nmol/L，受体浓度大于 20 nmol/L 时，这种情况非常容易发生。如果蛋白质-DNA 亲和力比较低，必须要保证蛋白质有较高浓度时，最好用不标记的蛋白质，然后通过测量 DNA 构象改变来观察蛋白质对 DNA 的作用（Joo et al. 2006）。

## 表面制备

为了能够长时程研究单个生物分子的构象改变，分子在空间上必须是固定的。这一

般是通过表面固定来实现（Rasnik et al. 2005）。一个理想的表面应该是能够特异性固定 DNA、RNA 或者蛋白质，而且可以排除非特异性吸收。对于核苷酸研究，我们倾向于用一个包被了生物素化 BSA 和中性链亲和素（或者链霉抗生物素蛋白）的玻璃（或石英）表面，因为这样的系统非常简单（图 2-5A）。与不包被生物素或者中性链亲和素的对照实验相比，我们可以高特异性地（>500∶1）固定 DNA（或者 RNA），而且还可以可靠地保证它们在溶液中的活性（McKinney et al. 2003，2005；Tan et al. 2003；Hohng et al. 2004b；Murphy et al. 2004；Nahas et al. 2004；Lee et al. 2005）。这可能是因为这三种表面成分（BSA、中性链亲和素和玻璃）在中性 pH 时都是负电荷，可以很好地排斥核苷酸。

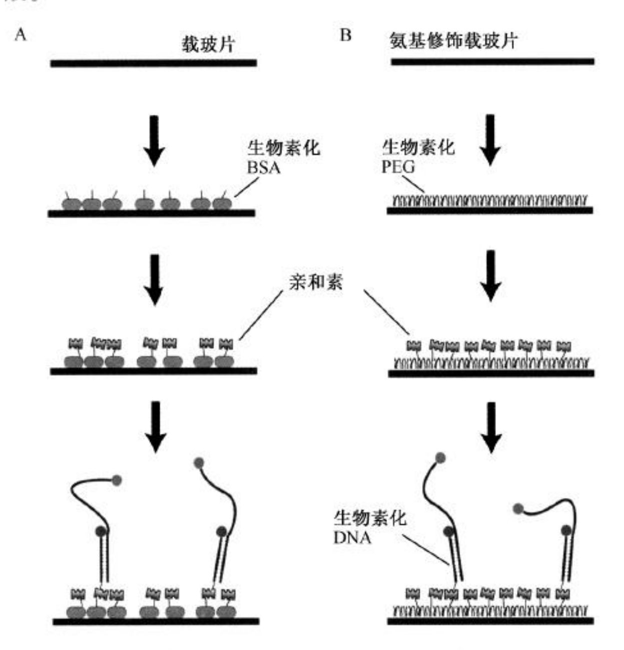



图 2-5　样本固定。A. 在裸露的玻璃表面（glass slide），生物素化的 BSA（biotinylated BSA）沉淀在玻璃表面，然后抗生物素（neutravidin）与生物素化的 BSA 交联。生物素化的样本（这里是 DNA）通过生物素-抗生物素结合被固定。B. 在氨基修饰的玻璃表面（amine-modified glass slide），PEG 的 NHS-酯形式与之共价交联，抗生物素特异地与在末端有生物素的 PEG（biotinylated PEG）分子相互结合。

如果研究蛋白质，那么 BSA 包被的表面黏附性太强。因此，我们采用聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）包被的表面来将蛋白质的非特异性吸附降低到不能被检测的水平（图 2-5B）。自从 2002 年第一次在单分子研究中用 PEG 来钝化表面之后（Ha et al. 2002），很多小组也成功采用此方法进行单分子研究。如果在玻璃的表面形成厚厚的一层 PEG，它能形成一个聚合物刷从而阻止蛋白质吸附到其下的玻璃表面。我们将 PEG 聚合物的一小部分进行末端生物素化修饰，并以此来固定中性链亲和素，从而进一步固定生物素化的大分子。蛋白质特异性地与固定在 PEG 包被表面的 DNA 相互作用，在我们检测的所有系统中，它们的生物活性都是可以重复的（Ha et al. 2002；

Rasnik et al. 2004；Myong et al. 2005；Joo et al. 2006）。我们还建立了一种小泡包装技术，它可以测量没有固定在表面的生物分子的构象动态变化（Okumus et al. 2004；Cisse et al. 2007）。实验方案3介绍了将单分子固定在BSA或PEG包被表面的方法。

## 数据获取

### 单分子成像

在表面通常有一些荧光杂质，如果没有单分子成像这方面的经验，很难区分目的分子与荧光杂质。实验方案4主要涉及这方面内容。

### 成像缓冲液

如果用除氧系统和还原剂（Rasnik et al. 2006），会大大增加Cy染料（主要是Cy5和Cy5.5）的光稳定性。成像缓冲液的配置在实验方案4中有详细描述。除氧系统含有0.4%（*m/V*）β-D-葡萄糖或者0.8%（*m/V*）D-葡萄糖、1 mg/ml（165 U/ml）葡萄糖氧化酶、0.04 mg/ml（2170 U/ml）过氧化氢酶。偶联反应如下：

$$\beta\text{-D-葡萄糖} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}} \text{葡萄糖酸} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} H_2O + \frac{1}{2}O_2$$ （Benesch and Benesch 1953）

三重态猝灭剂或者还原试剂能进一步增加Cy染料的光稳定性。之前，我们采用140 mmol/L β-巯基乙醇（β-ME）（Zhuang et al. 2000），但是最近我们发现Trolox在猝灭三重态时更有效，而且使用浓度比β-ME要低（1～2 mmol/L）（Rasnik et al. 2006）。

### 数据获取程序

在我们的成像系统中，荧光信号是用自己编写的Visual C++软件（微软）实时记录的，时间分辨率为30 ms或更高（见下文，检测器选择）（程序可索取）。软件可以从相机拍摄的录像中提取每一帧图像，然后将所有帧图像作为单个大的文件写入硬盘，每个像素值为8 bit。一般来说，每一帧曝光时间为100 ms，长为1 min的录像需要150 MB的硬盘空间。然后，在利用IDL编写的脚本（程序可通过Research System索取）就能从这些记录的录像中求得单分子轨迹。因为光学系统存在一些偏差以及非尽善尽美的排列，因此供体受体成像不能简单地叠加。通过利用IDL脚本和用荧光珠子获得矫正图像（见实验方案6），我们能够确定两个通道的多项式分布，包括尺寸改变、旋转和剪切扭曲等。

## 时程轨迹的后期加工

单分子轨迹的基本数据分析可以利用Matlab编写的软件和Origin来分析（可索取）。

### 计算FRET效率

我们利用下面的公式来进行表观FRET效率计算：

$$E_{app} = \frac{I_A}{(I_D + I_A)}$$

式中，$I_D$ 和 $I_A$ 分别为供体和受体致敏发射强度。我们实际所测量的是供体通道和受体通道的原始强度，$I_D^0$ 和 $I_A^0$，然后我们需要矫正供体信号漏入受体通路的部分（α），通常利用只存在供体时计算得到该值，一般是供体信号的 10%～15%，这样我们从 $I_A^0$ 中减去 $\alpha \times I_D^0$，理论上被矫正的受体信号为 0（$E_{app}=0$）。目前关于我们是否将减掉的受体信号再加回到供体信号还没有统一，尽管我们倾向于不把它加回去。

$$E_{app} = \frac{(I_A^0 - \alpha \times I_D^0)}{(I_D^0 + I_A^0 - \alpha \times I_D^0)}$$

还有一种矫正也需要进行，因为根据光学特征，受体信号也能部分地漏入供体通道。

绝对 FRET 值可以从上述通过一个矫正因子被矫正的 FRET 中推测出来（Ha et al. 1999）。FRET 效率可以通过下述公式计算：

$$E = \frac{I_A}{(I_D + \gamma \times I_A)}$$

式中，γ为代表了两个染料相对检测效率和量子产率的参数，可以通过光漂白确定它的值。我们用 Cy3 和 Cy5 得到的 γ 值约为 1。因此，通过公式 $E \equiv I_A / I_A + I_D$ 就可以计算出 FRET 效率。

## 典型的轨迹和一般分析方法

如果 smFRET 数据表现为时间波动（图 2-6，见图版），那么，根据不同的波动形式，这些数据需要用下文介绍的方法，如停顿时间（dwell-time）、交叉相关分析（cross correlation）或者隐匿马尔可夫模型（hidden Markov modeling）进一步分析。注意一个单分子轨迹的典型特点是一步漂白。

**停顿时间分析**

如果只有两种 FRET 状态，A 和 B，它们彼此交换（图 2-6A，B），那么我们测量每个状态的停顿时间，然后计算转换的动力学速度。通过手动或自动的阈值分析来选择每一次的转换，然后，得到每种状态的停顿时间柱状图并以此获得寿命（$\tau_A$ 和 $\tau_B$，图 2-6C）以及相应的转换速率，$k_{A\to B}$ 和 $k_{B\to A}$。

**交叉（或自动）相关分析**

当两种状态波动的时程太快，无法合理地分析停顿时间（图 2-6D），我们可以进行相关分析。例如，交叉相关能够告诉我们供体和受体的荧光强度是否以相关方式波动，如果是，那么它们的时程是

$$CC(\tau) = \int I_D(t) I_A(t-\tau) dt$$

理想状态下，能够得到一个曲线，从一个负值开始，逐渐衰减至零。然后，利用单次幂曲线拟合

$$-Ae^{-(k_{A\to B}+k_{B\to A})\tau}$$

可以得到两种状态的和（图 2-6E，右）。如果 FRET 效率柱状图能够展现两种状态相对的数量（图 2-6E，左），也就是 $k_{A\to B}/k_{B\to A}$，而且我们也可以得到 $k_{A\to B}$ 和 $k_{B\to A}$（Tan et al. 2003；Joo et al. 2004）。

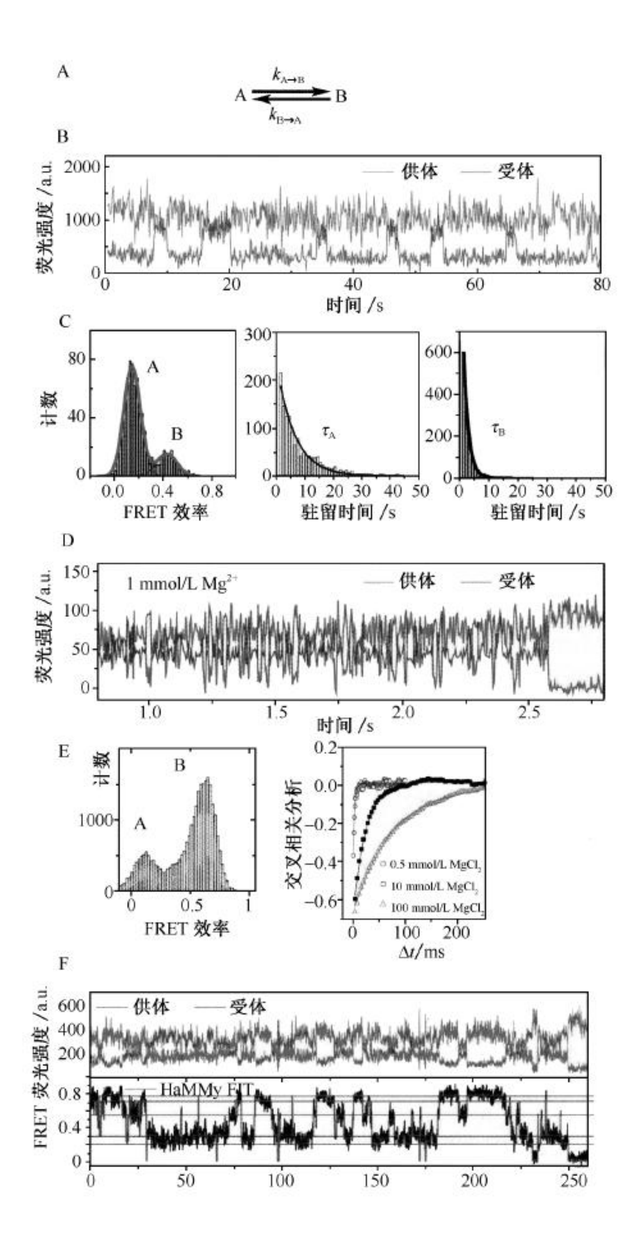



图 2-6 平衡下的构象动力学。A. B～E 图列出的双态动力学图示。B. 一个 sm 追踪显示高 FRET 和低 FFET 的两种状态之间的波动。供体信号（绿色）与受体信号（红色）是不相关的（Hohng et al. 2004a）。C. 左图是由 B 图中数据得到的 FRET 柱状图，右侧两幅显示了低 FRET 和高 FRET 状态的停顿时间（dwell time）分布。$\tau_A$ 等于 $1/k_{A\to B}$，$\tau_B$ 等于 $1/k_{B\to A}$。D. 当两种状态波动太快时，很难用停顿时间分析，因此，采用交叉相关分析方法（Joo et al. 2004）。E. 左图是由 D 图中数据得到的 FRET 柱状图，右图是在不同盐浓度下受体和供体时间追踪的交叉相关分析。F. 当存在两种以上的状态时［这里有 6 种，包括受体的光闪烁（photoblinking)］，数据分析需要用更高级的运算方法，如隐匿马尔可夫模型。在 FRET 示踪上的拟合（绿线）是用的隐匿马尔可夫模型分析（Joo et al. 2006）。

**隐匿马尔可夫模型**

如果有两种以上状态（图 2-6F），再用停顿时间和相关分析就需要更复杂和耗时的程序。在这种情况下，推荐使用无偏差分析工具，如隐匿马尔可夫模型（HaMMy）。HaMMy（可以从 http://bio.physics.uiuc.edu/HaMMy.html 下载）比传统的阈值分析方法更可靠，有更高的重复性，而且不易受到人为偏差的干扰（McKinney et al. 2006）。一旦利用 HaMMy 产生了理想的轨线，就可以利用转换密度图来判断不同 FRET 状态的存在以及它们怎样彼此相关。

不是所有的数据都适合 HaMMy 分析，一个经验法则是：如果你能够肉眼看到存在不同的状态，但是无法下手进行定量分析，那么就用 HaMMy 分析。在每个踪迹上，数据需要有很多转换。理想条件下，所有的状态都应当观察多次来获得最佳结果。每个状态的寿命都应该在最小数据的时间分辨率之内，如果有很多状态，有独自的 FRET 值，那么这个运算法则的马尔可夫特性就不能工作，至少不能合理地工作。总而言之，HaMMy 是很强大的，但不是万能的。

## 其他示踪类型

**记录中溶液改变**

在测量中通过流动改变液体条件（见实验方案 3），可以实时观察分子的反应（图 2-7A）。

**信号消失**

当 FRET 为零时，需要区分是因为受体的光漂白导致还是转换为一个真正的低 FRET 状态。受体的直接激活是检测的最直接方法（图 2-7B）。如果反应后总信号丢失，则没有直接的方法可以判断是反应的结果还是供体分子光漂白的结果（图 2-7C）。只要检测的生化反应允许，我们可以通过测量在相同条件下供体分子的漂白时程来作为一个对照。另外，我们还可以在不同的激光激发强度下进行同样的反应来检测反应时间是否依赖于激发光能量。如果是这样，那么荧光丢失很有可能是因为光漂白。

**信号出现**

当一个染料标记分子在溶液中出现时，它结合到固定分子上可以导致荧光信号的出现。就像上文解释的那样（见上文，标记的蛋白质），如果接近的分子是供体（供体被标记荧光），那么分子结合的时间很容易就可以判断（图 2-7D）。

## FRET 柱状图

FRET 柱状图是通过分析不同成像区域内几千个分子中，每个分子的前 10 帧图像的平均 FRET 效率来建立的。当一个峰值只代表一种 FRET 状态，那么它一般比半宽度（full-width-half-maximum）小 0.1（图 2-6C，左图）。统计学和仪器噪声限制了峰值的进一步分辨率。

因为 FRET 柱状图是在大量分子的基础上建立起来的，它提供了最快，也是最无偏差的统计学数据。例如，图 2-8 所示，不同浓度 KCl 非常清晰地改变了 FRET 柱状图的分布。经过这种不同溶液条件下的快速检测之后，我们就可以进行下一步更严格也是更耗时的步骤——记录 smFRET 踪迹，并一个一个仔细分析。

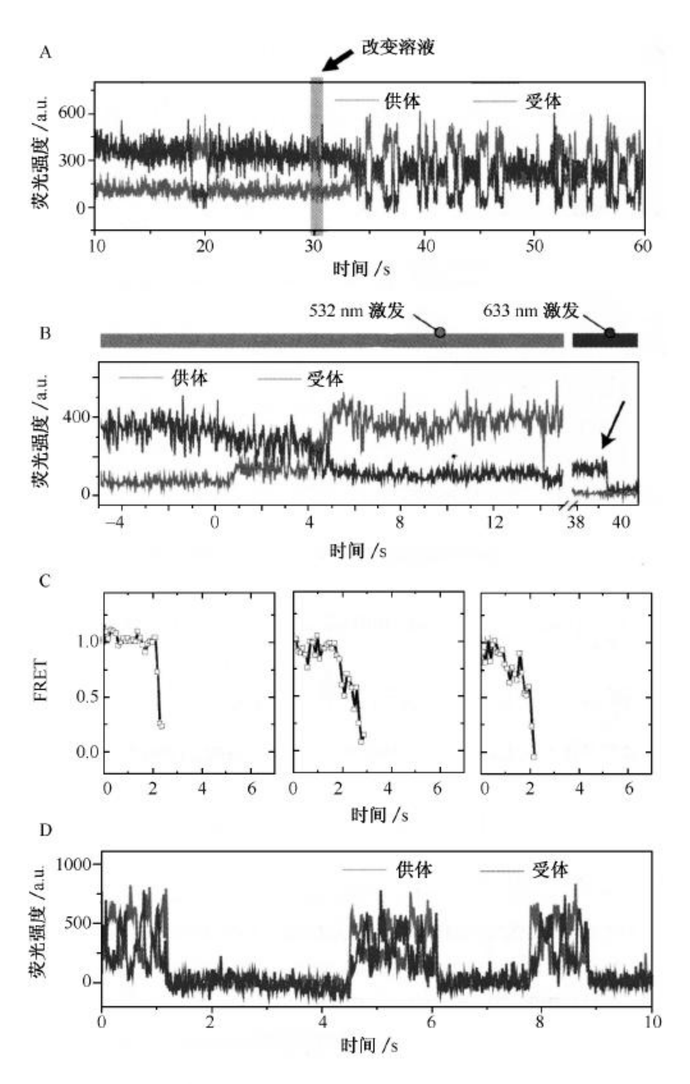



图 2-7 非平衡构象动力学。A. 在 $t$ 约为 30 s 时，溶液改变，构象改变发生（Buranachai et al. 2006）。B. 在 $t$ 约为 0 s 时，FRET 降到接近 0。通过在 $t>38$ s（箭头所示）时直接激活受体，证实受体具有活性（Joo et al. 2006）。C. 当一个能够解旋 DNA 双链的蛋白质与固定在表面的 DNA 相互作用时，不但能够观察到 FRET 信号，还发现总信号突然消失（Ha et al. 2002）。D. 如果受体标记的 DNA 固定在表面，当标记蛋白质（供体）与 DNA 相互作用时，可以观察到 FRET 信号（Myong et al. 2005）。

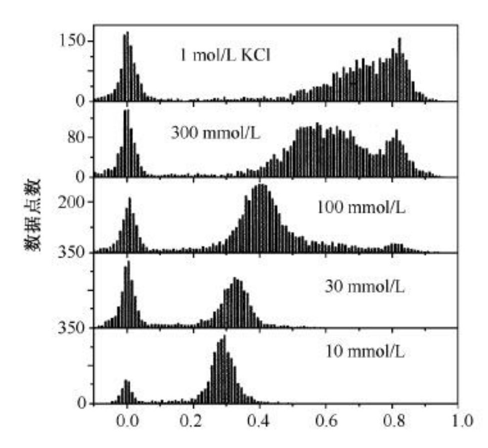



图 2-8　FRET 柱状图。FRET 柱状图分布的改变揭示在不同钾离子浓度下四元 DNA 的不同构象。在 $E=0$ 时的峰值代表只有供体分子（Lee et al. 2005）。

失活的受体分子导致了 $E_{app}=0$ 的峰值。在理论上，这种 FRET 值不可能小于零。在实际中，$I_A$ 太小了，无法使 FRET 接近零，而背景噪声水平使得 $I_A$ 在减除背景后成为负值，从而使 FRET 值小于零。同样的原因，如果理论上 FRET 值接近 1 时，计算出的 FRET 值也会大于 1。

## 装置的设计和搭建

我们的实验装置是搭建在一个市售的倒置显微镜上（Olympus）。TIR 显微镜已经商品化，但是我们还是倾向于自己搭建，因为这样造价低而且适应性高。定做的附件可以分为激发部分和发射部分。Cy3 分子可以被 Nd：YAG 激光（532 nm）激发。Cy3 和 Cy5 的荧光信号经过长通滤光片，然后被油浸物镜（物镜型）或水浸物镜（棱镜型）获取。供体和受体信号被二色镜分开并被 CCD（时间分辨率达 1 ms）获取。观察视野为 25 μm × 50 μm。下面将详细介绍成像设备的搭建。图 2-9C 展示了三色平台的发射光路。

### 检测器的选择

在高速 CCD 成像中，需要放大信号来对抗读出噪声。新一代的电子放大 CCD 相机（iXon，Andor Technology）利用芯片放大，能够增加最小的噪声（噪声最多增加散粒噪声的 50%），而且可以通过放大减少读出噪声。与硅雪崩光电二极管（silicon avalanche photodiodes，APD）相比，Back-thinned 版本可以获得整个可见光范围 80%～90%的量子产率。如果不采取 binning（译者注：像素合并读出），对于 512×512 像素来说，时间分辨率是 30 ms，对于 512 × 256 像素来说，时间分辨率是 16 ms。如果采用2×2 binning，我们能获得 8 ms 的时间分辨率。EMCCD（iXon，Andor Technology），128 × 128 像素的时间分辨率在没有 binning 的情况下可以达到 2 ms 的分辨率，在有 binning 的情况下可以达到 1 ms。我们把 CCD 芯片的温度设在－75℃，用 230 的

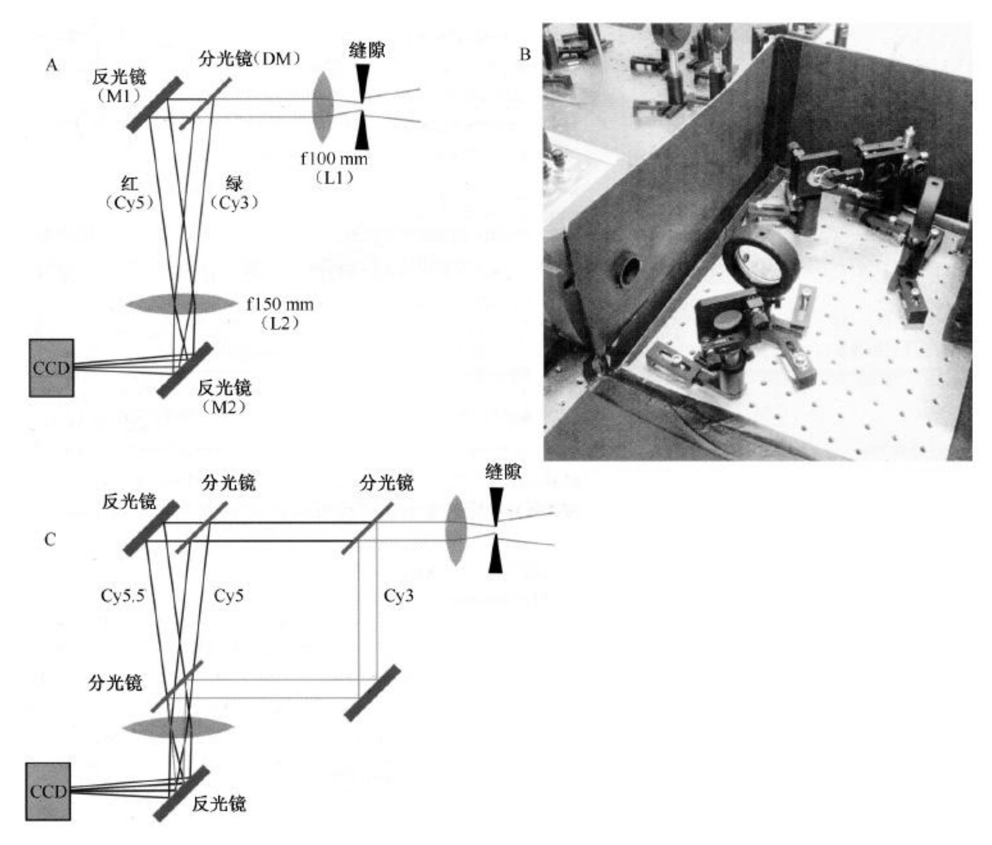



图 2-9 发射光路。A. 在两色发射通路中，校准光束首先经过一个二色镜（dichroic mirror，DM），在这里供体信号被反射。然后经过一个棱镜（M2）后，供体和受体的图像成像在 CCD 的屏幕（各占一半）。B. 二色平台的鸟瞰图。C. 在三色平台中，供体信号首先被分开，然后另外两种颜色利用 A 图中的通道分开。供体信号以及通过另外一个二色镜（dichroic mirror，DM）分开的图像都透射到 CCD 上。

增益来获得单分子轨迹。

利用雪崩光电二极管的共焦检测的优点还有：①更好的时间分辨率（但是最终的实时分辨率受到荧光团光物理特性的限制，采用 Trolox 可能会有所改进）；②可以进行寿命检测（Laurence et al. 2005）。第 5 章描述了利用共焦显微镜检测 smFRET。

## 光学平台

一般应用光学平台或激光平台（如 RPR Reliance Series with RL-2000 Series Lab-Legs，Newport），但是在一个实验平台或桌子上安装一个 1 in 厚的平板（Newport），上面有均匀的、大小为 1/4 in-20 的螺纹孔对于 TIR FRET 也足够了。

## 物镜型 TIR 显微镜

在物镜型 TIR 和棱镜型 TIR 中，我们更倾向于应用物镜型 TIR，因为它操作比较

方便。在过去，物镜型 TIR 的受体通道背景非常高，限制了它在 FRET 中的应用。然而，新一代 1.4 数值孔径（numerical aperture，NA）的油浸物镜（如 Olympus 的 UplanSApo）很大程度上解决了这个问题。尽管看上去背景仍然比棱镜型 TIR 高，但是单分子实际的信噪比两者没有太大的差距。仔细安装（就像实验方案 5 中详细列出的）可以得到一个较大的激发区域，因而不需要再高 NA 的物镜，如 1.45 NA（可以出现球面像差和）或者 1.65 NA（需要特殊的玻璃盖玻片和高反射指数的浸润油）。实验方案 6 中列出了搭建检测光路的要点（见图 2-9）。

## 棱镜型 TIR 显微镜

棱镜型 TIR 在第一次搭建后（见实验方案 7）成为 smFRET 的主要成像工具。这个平台的限制是：①通常很难鉴定样本表面的激发区域；②平皿的上表面贴着棱镜，非常不方便；③它需要相对贵而且易脆的石英载玻片。这些限制都被物镜型 TIR 所克服。然而，只有在棱镜型 TIR 才可以应用流式技术（见实验方案 3）。因为流式的引入使得成像表面弯曲，在物镜型 TIR 是一个盖玻片，这在数据获取时会导致离焦。

## 实验方案 1：DNA（或 RNA）的标记

这个标记核苷酸的实验方案最适合 5 nmol DNA 的标记，而且 DNA 序列中有一个氨基修饰的胸腺嘧啶。它是 Invitrogen 公司提供实验方案的简化版本。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

二甲基亚枫（DMSO；Fisher Scientific）< !>
DNA 样本
染料（单功能 NHS 酯形式）
Alexa 和其他染料（Invitrogen）
Cy3［GE Healthcare（PA13101）］
Cy5［GE Healthcare（PA15101）］
Cy5.5［GE Healthcare（PA15601）］
乙醇（预冷）
HCl（12.1 mol/L）< !>
氯化钠（NaCl，3 mol/L；Fisher Scientific）
四硼酸钠（Fisher Scientific）

设备

微量离心管
分光光度仪

### 方法

1. 将 DNA 溶解入 MilliQ $H_2O$（18.5 MΩ），使终浓度为 1 mmol/L。
   Tris 或化合物带有干扰标记试剂的氨基基团。在标记之前通过乙醇沉淀寡核苷酸法去除它们。
2. 准备新鲜的标记缓冲液（0.1 mol/L），即将 380 mg 四硼酸钠溶解到 10 ml MilliQ $H_2O$ 中。然后加入 65 μl 12.1 mol/L HCl 或者等价物，调节 pH 为 8.5。
   高 pH 可以增强酰化反应速率，然而，它也能增加酯的水解。
3. 用 56 μl DMSO 溶解 1 mg 的染料（约 20 mmol/L）。
   将多余的染料储存在−20℃。在溶液中染料不是非常稳定。
4. 在微量离心管中混合下列成分：
   5 μl 溶解在 DMSO 内的 DNA
   25 μl 标记缓冲液（0.1 mol/L）

5 μl 1 mmol/L DNA 或者等价物（共 5 nmol）

这个组合可以给每个氨基提供 20 个染料分子。如果没有足够的 DNA，可以线性调整染料和标记缓冲液的量。

5. 将混合物轻轻混合，避光室温下放置 6 h 或者 4℃过夜。
6. 在混合物中加入 87.5 μl 冷乙醇和 3.5 μl 3 mol/L NaCl，在−20℃放置 30 min。4℃ 12 000$g$ 离心 30 min。仔细去除上清液。用冷乙醇轻轻漂洗沉淀物数次。风干 DNA（去除乙醇）。在适当的溶液中重新溶解沉淀物。
7. 通过比较 DNA（260 nm）和交联染料的吸收光谱来检测标记效率。一般能接近 100%。如果达不到，可以再进行一次纯化，如非变性 PAGE 来分离标记与非标记的 DNA，或者重复步骤 6。

# 实验方案 2：蛋白质的标记

本实验方案是以标记 *E. coli* Rep 解旋酶为基础（Rasnick et al. 2004），当标记其他蛋白质时，需要做一些调整（如不同的化学条件等）。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

缓冲液 A［50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.67），150～500 mmol/L NaCl，10%～25% 甘油；超声 20 min 除气］
二甲基亚枫（DMSO；Fisher Scientific）＜!＞
染料（单功能 NHS 酯形式）
- Alexa 和其他染料（Invitrogen）
- Cy3［GE Healthcare（PA13101）］
- Cy5［GE Healthcare（PA15101）］
- Cy5.5［GE Healthcare（PA15601）］

His 标记蛋白（约 10 ml，20 μmol/L 或等价物）
咪唑［1 mol/L（pH 8.0）；高纯度；Sigma-Aldrich］＜!＞
$Ni^{2+}$-NTA 琼脂珠（Qiagen）＜!＞
氮＜!＞
Tris-(2-羧乙基)磷盐酸盐（TCEP；Invitrogen）＜!＞

### 设备

色谱柱（Poly-Prep；Bio-Rad）
微量离心管
分光光度仪

## 方法

1. 用缓冲液 A 平衡 $Ni^{2+}$-NTA 珠子。将 His 标记蛋白（约 10 ml，20 μmol/L 或等价物）与 1.5 ml $Ni^{2+}$-NTA 珠子混合，然后将混合物放入一个色谱柱。除非有特殊说明，所有的实验方案在 4℃进行。
2. 用大于 4 倍柱状体积（column volume，CV）的缓冲液 A 冲洗柱子。然后用 1 CV 的溶解在缓冲液 A 中的 0.1～0.2 mmol/L TCEP 冲洗柱子，然后室温放置 10 min。再用 20 CV 的缓冲液 A 冲洗柱子。
3. 加入少量的（＜1 ml）缓冲液 A，然后将样本转移入 1.5 ml 管子（每管 500 μl 样本）。

4. 通过轻轻吹氮气 1min 来对样本除气（以获得最高标记效率）。迅速扣合管子，在室温下放置 10 min。
5. 用 50 μl DMSA（约 20 mmol/L）重新溶解 1 mg 染料。将多余的染料储存在－20℃。在溶液中染料不是非常稳定。
6. 将染料加入样本，终浓度为 1∶10（蛋白质∶染料分子）。重复步骤 4，避光轻轻混合两者并 4℃过夜。
7. 将样本放入色谱柱，用 10 CV 或更多的缓冲液 A 冲洗，直到所有的没有被交联的染料分子都被冲洗干净。
8. 将标记蛋白用溶解在缓冲液 A 中的 0.2 mol/L 咪唑洗脱至新的柱子。
9. 通过比较蛋白质（280 nm）和交联染料分子的吸收光谱检测标记效率。

使用质量差的咪唑可能导致 280 nm 高吸收，从而干扰了蛋白质浓度的正确测量。

# 实验方案 3：制备样本观察小皿

本实验方案是用 BSA 或者 PEG 包被的载玻片来制备样本观察小皿，单分子可以连接于其上并用来进行 FRET 研究。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

乙酸（预冷；Fisher Scientific）（用于 PEG 表面）
丙酮（Fisher Scientific）<!>
Alconox 清洗剂 <!>（用于 PEG 表面）
*N*-(2-氨乙基)-3-氨丙基三甲氧基硅烷（United Chemical Technologies）<!>（用于 PEG 表面）
生物素-PEG（$M_w$ 5000；生物素-PEG-SC；水解半衰期> 20 min；Laysan Bio）（用于 PEG 表面）
生物素化的牛血清白蛋白（BSA；Sigma-Aldrich）
生物素化的 DNA（50 pmol/L，溶解于合适的缓冲液，通常是含有 0.1 mg/ml BSA 的缓冲液 T50）
BSA（New England Biolabs）
缓冲液 T50 [10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），50 mmol/L NaCl]
Cy3 标记的 DNA（1 nmol/L，溶解于缓冲液 T50）
Cy3 标记的蛋白（1 nmol/L）
甲醇（Fisher Scientific）<!>（用于 PEG 表面）
mPEG（*MW* 5000；mPEG-SC；水解半衰期> 20 min；Laysan Bio）（用于 PEG 表面）<!>
中型亲和素（ImmunoPure NeutrAvidin Protein；Pierce）
氢氧化钾（KOH；1 mol/L 用 MilliQ 水配制；Fisher Scientific）<!>
碳酸氢钠（Fisher Scientific）（用于 PEG 表面）
链霉抗生物素（Invitrogen）

### 设备

自制的泵（PHD 22/2000 系列注射器泵；Harvard Apparatus）（可选择的，见步骤 8iii）
盖玻片（24 mm×40 mm，No. $1^{1/2}$，长方形；VWR）
钻石钻头（3/4 mm；Kingsley North 或者 UKAM Industrial Superhard Tools）
双面胶带（厚约 100 μm；3 m）
环氧基树脂（5 min；Devcon）

烧瓶（Pyrex；Fisher Scientific）（用于 PEG 表面）

玻璃染色小皿（Fisher Scientific）

针（规格为 26 号，3/8 in；Becton Dickinson）

移液枪头（200 μl）

丙烷喷枪（Bernzomatic）<!>

载玻片（玻璃显微镜，1 in× 3 in，厚 1 mm；Gold Seal）

载玻片（石英显微镜，1 in× 3 in，厚 1 mm；G. Finkenbeiner）（应用于棱镜型 TIR）

超声仪（Bransonic tabletop ultrasonic cleaner；Branson）

注射器（1 ml；Becton Dickinson）

管子（型号为 28 号，PTFE tubing；Hamilton）

## 方法

### 制备和清洗盖玻片和载玻片

1. 在玻璃载玻片上钻两个直径为 0.75 mm 的孔，形成小皿的进口和出口。将其中一个孔直径增大至约 0.8 mm 使之能够插入一根管子。溶液最终是通过这些孔注入的。
2. 在玻璃染色小皿里超声载玻片，先在 10%的 Alconox 清洗剂中超声 20 min，在水中超声 5 min，然后在丙酮中超声 15 min，在 1 mol/L KOH 中超声 20 min。最后换另外一个玻璃染色皿在 1 mol/L KOH 中超声 20 min。
3. 用去离子 MilliQ 水（18.5 MΩ）漂洗载玻片。
4. 用丙烷喷枪燃烧成像面，来移走任何荧光有机分子。燃烧用于棱镜型 TIR 的石英载玻片半分钟。对于物镜型 TIR 只需燃烧几秒，防止玻璃变形。

   制备 BSA-包被的表面，进行样本小皿制备（步骤 5 和步骤 6）和溶液注入（步骤7～步骤 9），然后进行步骤 10～步骤 14。制备 PEG-包被的表面，直接进行步骤 14～步骤 20。

### 样本小皿制备

在每次实验前快速组装小皿。

5. 在一个干净的载玻片上贴上两片双面胶带（厚约 100 μm），这样在两个胶带的中间有一个 5 mm 的空隙。将一个干净的盖玻片放在载玻片上形成一个体积为 10～20 μl 的样本小皿（图 2-10A）。当组装一个 PEG 包被的小皿时，需要确定把 PEG 包被的一侧面朝小皿的内侧。
6. 用环氧基树脂黏合剩余的样本小皿和外侧的缝隙。

### 溶液注射

7. 用一个 200 μl 移液枪头按需从一个小孔注入溶液。

   这个系统的优点是可以在同一个样本小皿中通过流入不同的溶液来改变溶液的条件。小孔可以在长时间的测量中尽可能减少蒸发，并减少溶液的氧摄取，从而减少光漂

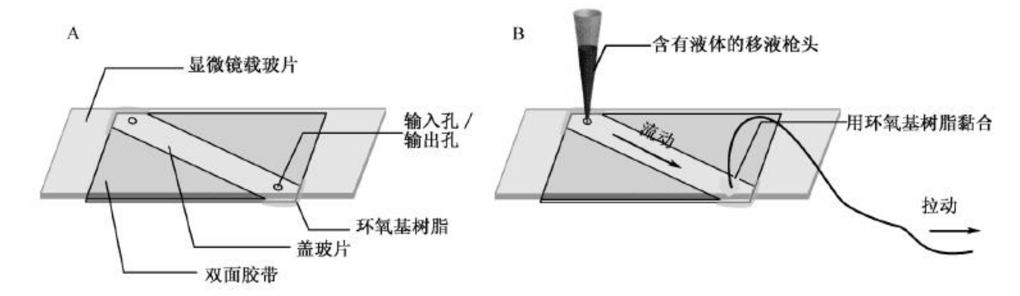



图 2-10 样本小皿。A. 样本小皿的制备是通过将一个显微镜盖玻片和载玻片用双面胶带连在一起，然后用环氧基树脂黏合。载玻片上的孔（输入孔/输出孔）是用于溶液的输入或输出。B. 注射器通过小管与小皿相连，含有液体的移液器吸头（pipette tip loaded with a solution）轻柔地插入一个输入孔。当拉动（suction）注射器，溶液就进入小皿。

白效应和溶液酸化。

8. 当数据获取时需要更换溶液（图 2-7A），利用下面的注射器系统（图 2-10B）处理。
   i. 通过在 0.8 mm 宽的孔上用环氧基树脂粘贴一个 28 号的管子来使组装的小皿形成流动的系统。
   ii. 将小管与 26 号，3/8 in 针相连，后者与 1 ml 注射器相连。
   iii. 通过缓慢插上 200 μl 移液枪头，然后给小皿注入所需溶液。手动或通过自动的泵拉动注射器。
9. 使用后，将小皿放入瓶装水中过夜，这样可以移走双面胶带和环氧基树脂，从而使载玻片可以循环利用。

## BSA-包被的表面

在每次实验前制备表面（图 2-5A）。

10. 制备溶解于缓冲液 T50 的生物素化的 BSA，浓度为 1 mg/ml。流入小皿 30 μl 这种溶液。放置 5 min。

    BSA 非特异性吸附小皿表面。
11. 流入 100 μl 缓冲液 T50，将生物素化的 BSA 溶液洗脱。
12. 用缓冲液 T50 制备浓度为 0.2 mg/ml 的抗生物素或中性亲和素溶液。将 30μl 这种溶液流入小皿。孵育 1 min，重复步骤 11 洗脱。
13. 在小皿中加入 30 μl 生物素化的 DNA（浓度为 50 pmol/L）。

    这个步骤能使试剂广泛沉积，而且不使样本干掉，并且产生的 DNA 表面浓度适合用于 sm 成像。关于 DNA 固定的其他信息可以在实验方案 4——成像单分子中找到。

## PEG-包被表面

14. 将干净的盖玻片和载玻片放回含有甲醇的玻璃染色皿。
15. 进行下列步骤来利用氨基修饰载玻片和盖玻片。
    i. 通过超声用甲醇清洗耐热烧瓶 5 min。

ii. 将 100 ml 甲醇、5 ml 乙酸和 1 ml 氨基硅烷混合。

iii. 将玻璃中的甲醇快速替换为上述混合物。孵育 20 min，期间超声 1 min。

iv. 将混合物替换为甲醇。然后在甲醇中储存上述载玻片和盖玻片，直到进入下一步骤。

16. 根据下列步骤用 PEG 包被氨基修饰表面。

i. 用 MilliQ 水漂洗载玻片。然后放在一个平的表面。

ii. 制备反应溶液，每个载玻片需要在新配制 64 μl 的 0.1 mol/L 碳酸氢钠中溶解 0.2 mg 生物素化 PEG 和 8 mg mPEG。7200 *g* 离心 1 min 去除气泡。

iii. 在每个载玻片上加入 70 μl 反应溶液。上面放置一个盖玻片使溶液均匀铺开，并防止蒸发。

iv. 在避光潮湿的环境孵育玻片/盖玻片夹层过夜。可以利用一个底部加水的盒子来保证潮湿。

v. 将上述夹层分离，用 MilliQ 水漂洗，然后储存在－20℃直到使用。在进行步骤 17～步骤 20 之前，先根据步骤 5 和步骤 6 进行样本小皿制备，以及步骤 7～步骤 9 进行溶液注射。

17. 装配后，注入缓冲液 T50，孵育 5 min。然后通过注射溶解在缓冲液 T50 中的 1 nmol/L Cy3 标记的 DNA 来检测 DNA 的非特异性标记。

18. 接下来，加入 1 nmol/L Cy3 标记的蛋白质来检测蛋白质的非特异性标记。

我们使用的是 Rep 解旋酶，但是任何黏性蛋白都可以很好地工作。

在两种情况下，在一个好的 PEG 包被的表面，在 25 μm × 50 μm 的成像范围内观察到的分子应该小于 10～20 个。

19. 一旦小皿通过了质量检测，在小皿里加入 30 μl 溶解在缓冲液 T50 中的 0.2 mg/ml 的中性亲和素溶液。孵育 1 min，然后通过流入 100 μl 缓冲液 T50 清洗中性亲和素溶液。

20. 加入 30 μl 生物素化的 DNA（溶解在恰当的溶液中，50 pmol/L）。如果需要可以调整浓度。参照实验方案 4——成像单分子，来进一步完成 DNA 固定。

如果 pH 低于 7.4，可以导致 DNA 非特异性地黏附于 PEG 表面。

# 实验方案 4：单分子成像

本实验方案描述了单分子的成像，重点介绍如何区分杂质与目标分子。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

BSA（New England Biolabs）
缓冲液 T50 [10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），50 mmol/L NaCl]
过氧化氢酶（来自牛肝脏；Roche Applied Science）
Cy3 标记的生物素化的 DNA（50 pmol/L）
D-glucose（葡萄糖；Sigma-Aldrich）或 β-D-glucose
葡萄糖氧化酶（来自 *Aspergillus niger* [Type VII]；Sigma-Aldrich）<!>
巯基乙醇（BME，B-Mercaptoethanol；14 mol/L；Acros Organics）<!>
Trolox（6-羟基黄酮 2-醌-2-羧酸；Sigma-Aldrich）<!>

准备 Trolox 的储存液（约 2 mmol/L）：在室温下将 30 mg 的 Trolox 粉剂溶解入 10 ml 的水中。漩涡振荡 1 min。用 0.2 μm 注射器滤膜过滤。测定其 290 nm的吸收光谱 [消光系数（2350±100）$M^{-1} \cdot cm^{-1}$] 来估算浓度。Trolox 可以使 pH 降低，因此需要加入 NaOH 来调整到合适的 pH。将 Trolox 溶解入中性 pH 比溶解入纯水可以获得更好的溶解度。溶液避光存储在 4℃可以稳定储存至少 15 天。

### 设备

滤膜（0.2 μm 注射器滤膜；Nalgene）
分光光度计
漩涡振荡器

## 方法

1. 制备除氧系统，含有 0.4 %（*m/V*）β-D-葡萄糖或 0.8%（*m/V*）D-葡萄糖、1 mg/ml（165 U/ml）葡萄糖氧化酶和 0.04 mg/ml（2170 U/ml）过氧化氢酶。先制备缓冲液储存溶液，然后加入葡萄糖，可以保证长时间储存不降解。100×gloxy 溶液（葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶混合物）配方如下。

   i. 在 80 μl 缓冲液 T50 中加入 20 μl 过氧化氢酶（0.2 mg/ml）。

   ii. 在上述混合物中加入 10 mg 葡萄糖氧化酶。轻弹混匀（不要振荡）。

   iii. 离心 1 min。

   iv. 收集上清液，在 4℃储存（如果需要可以储存几个月）。

v. 在测量前将 gloxy 加入缓冲溶液，尽量避免溶液暴露于空气（见实验方案 3）。

除氧系统反应可以产生酸。因此，如果样本能够与空气接触，长时间后溶液会变得非常酸。正确进行步骤 v 可以大大减少这种酸化可能。

2. 为进一步增加 Cy 染料的光稳定性，可以加入一个三重态淬灭剂，如 Trolox（优先选择；浓度大于 1 mmol/L）或者 140 mmol/L BME。
3. 用加入缓冲液 T50（或成像缓冲液）的空白小皿表面成像（图 2-11A）。然后通过生物素-抗生物素交联固定 50 pmol/L Cy3-标记分子（见实验方案 3——制备样本小皿）。比较相同激发强度和相同缓冲液下空白样本的最终密度（图 2-11B）。通常，碎片分子不会比 Cy 染料亮。除非碎片分子的密度和强度非常高，否则我们认为表面足够清洁，可以进行 sm 荧光实验（见排疑解难）。

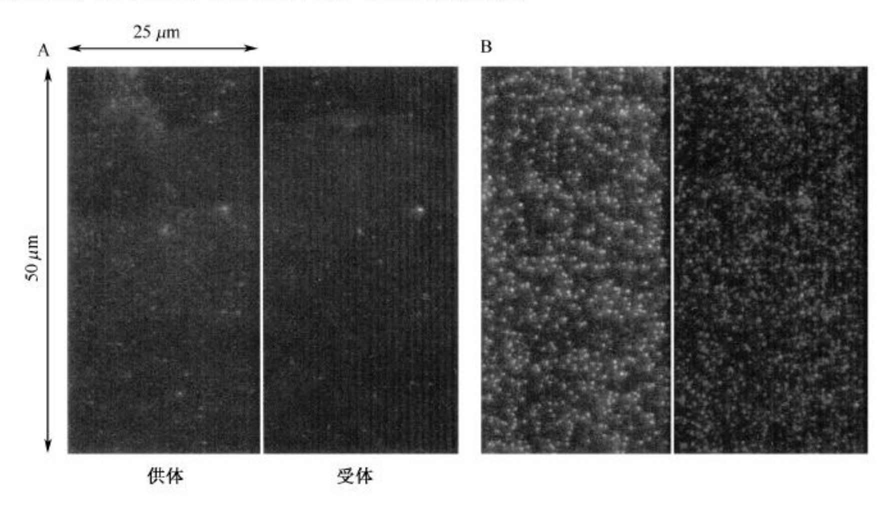



图 2-11 单分子成像。A. 空白小皿的成像。图片被分为两个通道，供体通道和受体通道，成像范围为 25 μm × 50 μm。可以看见几个荧光碎片分子。B. 展示固定在同一个小皿上的 Cy3 分子，它比碎片分子要亮许多。

4. 如果表面密度太低，单分子实验会产生误导效果，因为杂质干扰会非常显著。因此需要单分子有合适的数量，才能降低杂质分子的相对浓度。一般在一个 25 μm × 50 μm的成像范围内的单分子数应该在 200 个左右。在缓冲液 T50 中加入 0.1 mg/ml BSA 可以阻止纳摩尔级浓度的样本丢失到管子或移液吸头的管壁（见排疑解难）。
5. 一旦得到合适的表面浓度，用 T50 洗去未结合的样本来阻止进一步的结合。

如果样本密度太高，在一个点或临近点可以找到多个分子，这会使分析非常困难。有时即便样本浓度相对低，有些时程最终的信号也可能来自多个分子，因此表现出不同的特性。

## 排疑解难

**问题**：碎片分子的强度和密度太高。

［**步骤 3**］

**解决方法**：可能性如下。

1. 表面不够清洁。仔细清洗表面。
2. 小皿组装时间太长。不要将小皿组装时间超过 1 周。
3. 双面胶带太脏。用干净的带子。
4. 固定和成像用的化学试剂太脏。更换它们。
5. 氨基硅烷被污染（如果是 PEG 包被表面），更换。

**问题**：即便是溶液浓度＞1 nmol/L，表面分子的浓度也太低。

［**步骤 4**］

**解决方法**：可能是固定用的生物素化样本或者化学试剂和蛋白质的制备都不理想（如果用正常的振荡器振荡蛋白质很容易使蛋白质失活）。

# 实验方案 5：物镜型 TIR 显微术：激发

本实验方案描述了物镜型 TIR 显微术（激发），包括激光和落射式荧光显微镜的搭建，以及后者如何改装成 TIR。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

### 设备

光束扩展器（一对透镜）

二色镜（长通，550 nm 切割波长；Chroma Technology）

二色镜（长通，645 nm 切割波长；Chroma Technology）（可选择）

激光［绿色；532 nm（Nd：YAG），75～150 mW；Coherent，LaserQuantum，Newport CrystaLaser］< !>

激光（红色；633 nm，HeNe，25～35 mW；Melles Griot）（可选择，见步骤 6）< !>

透镜（BK7 平凸透镜，直径 2 in，焦距比 300 mm；Thorlabs）

千分尺（两个；1 in 位移台；Thorlabs）

镜子（2 个；宽带电介质，直径 2 in；Thorlabs）

物镜（1.4 NA 油浸，100×，UPlanSApo；Olympus）

## 方法

1. 扩展激光束，使得光束腰宽为 20～25 mm。光路见图 2-12。

   例如，如果激光光束宽 2 mm，用 10 mm 和 100 mm 焦距比的平凸透镜来将之扩展 10 倍。

2. 检测光速通路。用一个 2 in 的镜子反射增宽的光束进入显微镜的后部（此处安装了一个长通，550 nm 切割波长的二色镜），这样光速正好垂直于物镜的平面并进入物镜。

3. 为了聚合光束，在光束通路上放置一个 300 mm 焦距比的平凸透镜（XY）。透镜 XY 和物镜的距离应该是透镜 XY 的焦距比，也就是 300 mm。一般来说，如果显微镜是 OLympus IX71，后部没有任何附属物，且光束参照步骤 1 进行校准，那么透镜 XY 应该放置在显微镜后部几英寸之外。

   安装距离存在几厘米的差距一般不会显著影响平台的总体质量。

4. 按照如下步骤搭建落射式显微镜。

   i. 因为透镜 XY 的水平部分和垂直部分都非常严格，用一对千分尺来安装透镜 XY。调整两个千分尺来获得落射式荧光显微镜。物镜应当出来同心圆。如果有所歪曲，回到步骤 2，通过移动镜子 M 的位置矫正激光的入射角以及激光的高度。

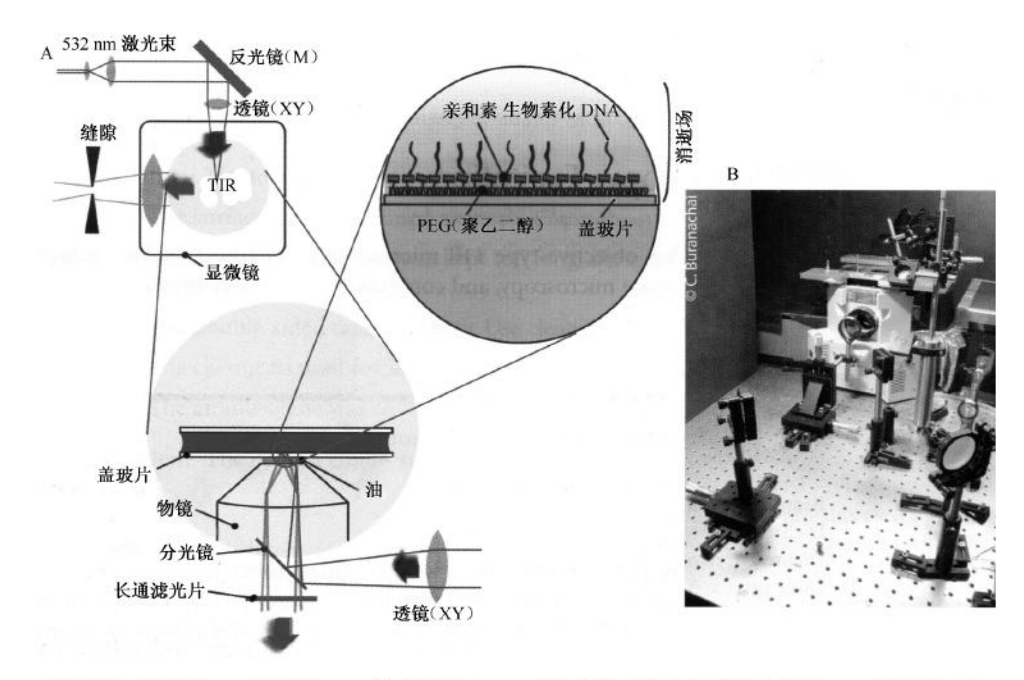



图 2-12　物镜型 TIR 显微镜。A. 模式图显示 TIR 发生在盖玻片和水之间的界面。B. 照片显示怎样在显微镜的后部引入扩展了的激光束。

ii. 安装发射光路（见实验方案 6)。

iii. 把含有固定 Cy3 标记分子的样本小皿放到显微镜平台。即便是在落射式显微镜状态下，也应该能看到亮度远大于背景的单分子。

5. 将落射式显微镜转变为 TIR 显微镜，调整透镜 XY 的垂直位置直到光束离开物镜并倾斜 90°（如果在发射通路上垂直放置一个光缝，那么在垂直方向的调整可以导致激发区域的最大视野）。做这个实验时，注意观测单分子成像的改变。当落射式荧光激发改变为 TIR 时，单分子周围的背景荧光会显著下降；同时，Cy3 单分子变得更亮。如果透镜 XY 的位置进一步改变，所有的信号会突然消失。

6. （可选择）安装一个红的激光来直接观察受体分子。安装长通，645 nm 切割波长的二色镜。

   当检测受体的分子是否存在时，这一步是需要的，用落射式荧光激发就可以实现这一目的。

## 实验方案 6：物镜型 TIR 显微术：发射

本实验方案描述了制备荧光珠样本以及物镜型 TIR 显微术（发射）装置的搭建。

### 材料

#### 试剂

荧光珠（荧光标记的羧基化的微球体，0.2 μm，深红色荧光）

Tris-HCl（1 mol/L，pH8.0）

#### 设备

带宽滤色片（穿透 680 nm±20 nm 的光；Chroma Technology）（可选择，用来直接激发受体；见步骤 6）

带宽滤色片来减少串色（可选择，见步骤 7）

二色镜（长通，550 nm 切割波长；Chroma Technology）

滤色片（长通，550 nm 切割波长；Chroma Technology）

滤色片架（用来固定二色镜；Thorlabs）

胶水

透镜（消色差双合透镜，直径 2 in，焦距比为 100 mm 和 150 mm；Thorlabs）

镜子（2 个；宽频绝缘，直径 2 in；Thorlabs）

剃刀片（2 个）

载玻片（玻璃）

### 方法

1. 按照如下方法制备荧光珠。
   i. 用 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）稀释荧光珠 500 倍。
   ii. 将上述溶液注入样本小皿（见实验方案 3——制备样本小皿），这样珠子可以黏附到未经处理的玻璃表面。
   iii. 如果需要长时间应用，可以封口。
2. 按照如下方法设置激光束通路。
   i. 在显微镜上放入一个荧光珠样本，将荧光信号导入一个侧孔。找到距离侧孔外几厘米的成像平面（图 2-9A，B）。
   ii. 将一个消色差透镜（L1；$f$，100 mm）放置在距离成像平面 100 mm 的距离。
   即使距离是正确的（如光束已经被矫正），光束腰的大小在 L1 之后也会改变，因为从侧孔出来的图像不是一个点。
   iii. 在光束最窄处放置一个镜子（M1）。
3. 为了在 CCD 照相机上成像，在距离 M1 5 in 的地方放置另外一个消色差透镜（L2；$f$，150 mm）。用另外一个镜子（M2）反射光束，在 L2 150 mm 之外的距离安

装 CCD。

通过比较肉眼成像和 CCD 屏幕上的图像来确保照相机放置在正确的焦平面。如果 L2 和照相机的距离大于 150 mm，光束则不能被 L1 很好校正。

4. 通过在一个玻璃载玻片的两端黏合两个刀片的方法制备一个垂直的、宽 2.5 mm 的裂缝。恰当固定之后，将裂缝滑动至步骤 2 中确定的成像位置。如果光束如图 2-9A 显示的一样穿行，那么调整 M2 的角度，将图像成在 CCD 屏幕的左侧。
5. 为了分开两种颜色，将一个二色镜固定在滤光片支架上。将 DM 放置在距离 M1 几毫米的位置。在调整 DM 的位置时，观察 CCD 屏幕，确定正确的 DM 位置/角度。固定镜子之后，通过改变 M1 或者 DM 的角度来调整供/受体图像的相对位置。两个图像的位置可以通过 M2 同时调整。

   这种分离两种颜色的方法可以导致 Cy3 和 Cy5 之间轻微的失常。然而，整个排列非常方便（而且可以根据不同的 FRET 荧光对来替换二色镜），这显然弥补了前一缺点。
6. 可选择：当应用一个红色激光来直接观察受体分子时，插入一个带宽为 680 nm±20 nm的滤光片。
7. 可选择：加入一个带宽滤光片来减少串色。

   理想的 FRET 分辨率需要两个检测通道最小的串色。例如，供体发射漏入受体检测器，以及受体成像漏入供体检测器。前者通常非常显著，因为荧光发射光谱是非对称的，有一个拖尾现象。在应用 Cy3 作为供体，Cy5 作为受体的典型实验中，如果二色镜是在 645～630 nm 分离发射光谱，那么 10%～15%的供体信号可以在受体通道检测到。受体漏入供体的信号相对不显著。所以添加带宽滤光片通常是有优势的，尽管最终的信号可能有所丢失。

# 实验方案7：棱镜型 TIR 显微术：激发

本实验方案描述了棱镜型 TIR 显微镜装置的搭建（激发）。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

设备

铜轴环，平板以及放置物镜的棱镜形支架（自制）
激光（绿色；532 nm［Nd∶YAG］，75～150 mW；Coherent，LaserQuantum，Newport CrystaLaser）＜!＞
激光（红色；633 nm，HeNe，25～35 mW；Melles Griot）（可选择，见步骤4）＜!＞
透镜（BK7 平凸透镜，直径 1/2 in，焦距比 50 mm；Thorlabs）
千分尺（3个；1 in 位移平台；Thorlabs）
镜子（宽带电介质，直径 1 in；Thorlabs）
物镜（1.2 NA 水浸，60×，UPlanSApo；Olympus）
棱镜［佩-布二氏（恒偏转）棱镜（石英玻璃，11.0×20.0×6.4）；EKSPLA］
热电偶（温度计；Omega）
管形材料
循环水域（NESLAB RTE-7 数字型单冷冻水域；Thermo Scientific）

## 方法

1. 在石英载玻片的顶部放置一个佩-布二氏棱镜，中间是薄薄一层浸润油来匹配反射指数（图 2-13）。
2. 将激发光束聚焦在佩-布二氏棱镜。当激发光束达到很窄的临界角（＜23°）时，就可以在石英载玻片和液面之间形成 TIR。
3. 通过调整透镜（$f$，50 mm）的位置来控制激发面积的定位和大小。重要的是，要确定棱镜支架的位置，而且要相对显微镜本身是固定的，这样才能保证当样本侧向移动以成像不同样本区域时，棱镜和激发光束不会移动。
4. 可选择：安装一个红色激光器来直接观察受体分子。
5. 通过一个循环水域（NESLAB RTE-7 数字型单冷冻水域）来调节样本的温度，后者通过管道与下列相连。
   i. 物镜上一个自制的铜轴环。
   ii. 控制样本细胞的平板。
   iii. 固定棱镜的金属片（图 2-13C，D）。
6. 用一个两边夹着石英载玻片和盖玻片的、放置在样本位置的热电偶测量温度。
   温度测量的误差小于 1℃。

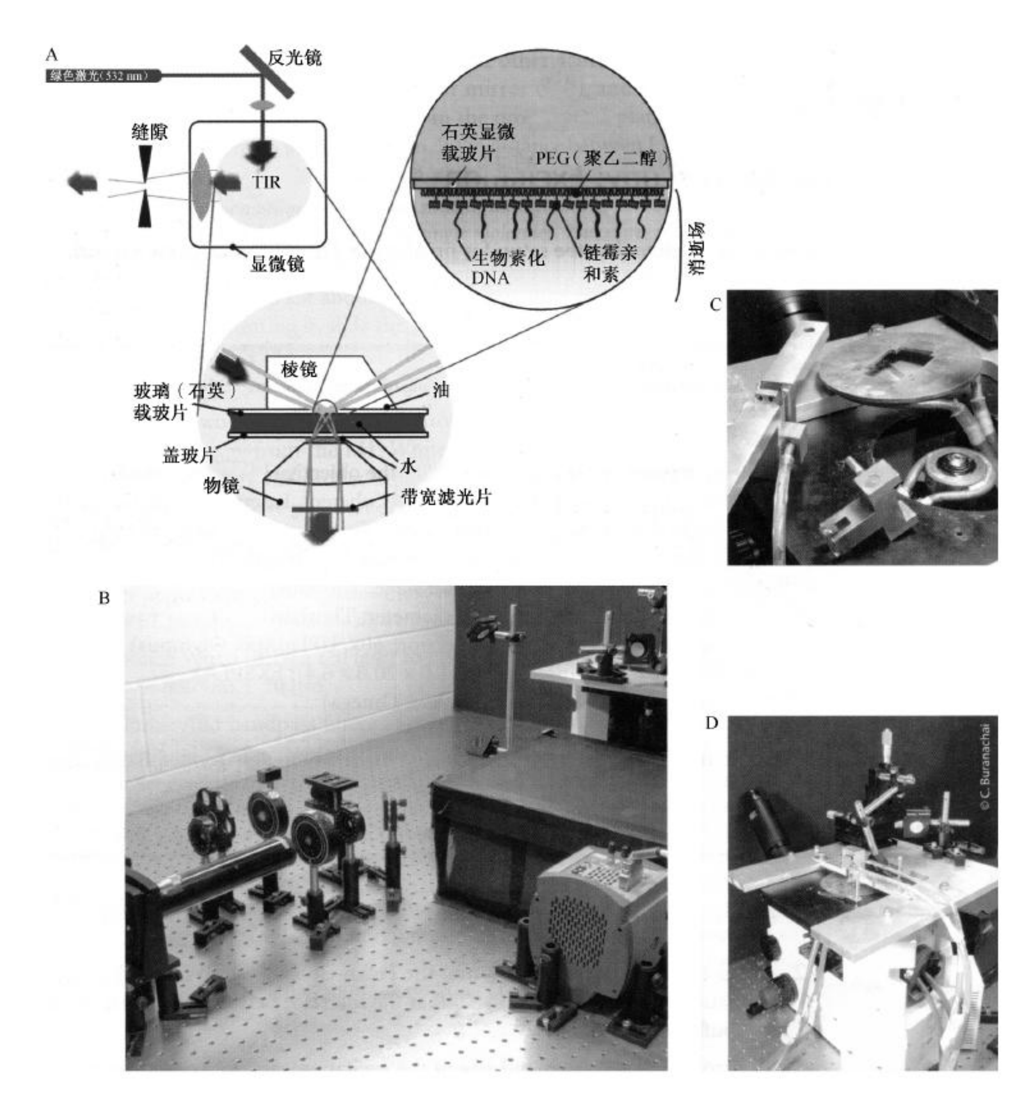



图 2-13　棱镜型 TIR 显微镜。A. 示意图显示怎样在石英表面和水之间的界面上形成 TIR；B. 照片是激发光路的鸟瞰图；C. 用于温度控制的成分：一个棱镜支架（底部，中心）、安全防倾杆（左）、控制样本细胞的平台、物镜上自制的铜轴环（中心）；D. 安装了列在 C 图中成分的显微镜系统。

## 实验方案 8：镜型 TIR 显微术：发射

主要参照实验方案 6——物镜型 TIR 显微镜：发射，做下述的调整。为了匹配物镜型 TIR 显微镜的 CCD 屏幕上分子的大小，应用 2.5×放大倍数，而不是 1.5×（因为水浸物镜是 60×，不是 100×）。因此，应用 $f=250$ mm 的消色差透镜，而不是 $f=150$ mm的以及应用 1.5 mm 宽的窄缝而不是 2.5 mm 宽的窄缝。

## 致谢

我们感谢 Chittanon Buranachai 提供专业的照片，Salman Syed 和 Julia Wright 对文章的仔细阅读，以及下列实验室成员对文章的各自贡献，他们是：Sungchul Hohng（三色），Sua Myong（蛋白质标记），Yongsun Kim（Trolox），Sean A. McKinney（HaMMy），Rahul Roy 和 Michelle Nahas。DNA 标记实验方案来自 Invitrogen。

## 参考文献

Benesch R.E. and Benesch R. 1953. Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. *Science* **118:** 447–448.

Blanchard S.C., Gonzalez R.L., Kim H.D., Chu S., and Puglisi J.D. 2004. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 1008–1014.

Buranachai C., McKinney S.A., and Ha T. 2006. Single molecule nanometronome. *Nano Lett.* **6:** 496–500.

Cisse I., Okumus B., Joo C., and Ha T. 2007. Fueling protein–DNA interactions inside porous nanocontainers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 12646–12650.

Clamme J.P. and Deniz A.A. 2005. Three-color single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *ChemPhysChem.* **6:** 74–77.

Clegg R.M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* **211:** 353–388.

Cornish P.V. and Ha T. 2007. A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2:** 53–61.

Forster T. 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* **2:** 55–75.

Ha T. 2001a. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11:** 287–292.

———.2001b. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25:** 78–86.

———.2004. Structural dynamics and processing of nucleic acids revealed by single-molecule spectroscopy. *Biochemistry* **43:** 4055–4063.

Ha T., Enderle T., Ogletree D.F., Chemla D.S., Selvin P.R., and Weiss S. 1996. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 6264–6268.

Ha T., Rasnik I., Cheng W., Babcock H.P., Gauss G.H., Lohman T.M., and Chu S. 2002. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature* **419:** 638–641.

Ha T., Ting A.Y., Liang J., Caldwell W.B., Deniz A.A., Chemla D.S., Schultz P.G., and Weiss S. 1999. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 893–898.

Heyduk T. 2002. Measuring protein conformational changes by FRET/LRET. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13:** 292–296.

Hohng S., Joo C., and Ha T. 2004a. Single-molecule three-color FRET. *Biophys. J.* **87:** 1328–1337.

Hohng S., Wilson T.J., Tan E., Clegg R.M., Lilley D.M., and Ha T. 2004b. Conformational flexibility of four-way junctions in RNA. *J. Mol. Biol.* **336:** 69–79.

Joo C., McKinney S.A., Lilley D.M., and Ha T. 2004. Exploring rare conformational species and ionic effects in DNA Holliday junctions using single-molecule spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **341:** 739–751.

Joo C., McKinney S.A., Nakamura M., Rasnik I., Myong S., and Ha T. 2006. Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution. *Cell* **126:** 515–527.

Laurence T.A., Kong X., Jager M., and Weiss S. 2005. Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 17348–17353.

Lee J.Y., Okumus B., Kim D.S., and Ha T. 2005. Extreme conformational diversity in human telomeric DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 18938–18943.

McKinney S.A., Joo C., and Ha T. 2006. Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophys. J.* **91:** 1941–1951.

McKinney S.A., Declais A.C., Lilley D.M., and Ha T. 2003. Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat. Struct. Biol.* **10:** 93–97.

McKinney S.A., Freeman A.D., Lilley D.M., and Ha T. 2005. Observing spontaneous branch migration of Holliday junctions one step at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 5715–5720.

Murphy M.C., Rasnik I., Cheng W., Lohman T.M., and Ha T. 2004. Probing single-stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* **86:** 2530–2537.

Myong S., Stevens B.C., and Ha T. 2006. Bridging conformational dynamics and function using single-molecule spectroscopy. *Structure* **14:** 633–643.

Myong S., Rasnik I., Joo C., Lohman T.M., and Ha T. 2005. Repetitive shuttling of a motor protein on DNA. *Nature* **437:** 1321–1325.

Nahas M.K., Wilson T.J., Hohng S., Jarvie K., Lilley D.M., and Ha T. 2004. Observation of internal cleavage and ligation reactions of a ribozyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 1107–1113.

Okumus B., Wilson T.J., Lilley D.M., and Ha T. 2004. Vesicle encapsulation studies reveal that single molecule ribozyme heterogeneities are intrinsic. *Biophys. J.* **87:** 2798–2806.

Rasnik I., McKinney S.A., and Ha T. 2005. Surfaces and orientations: Much to FRET about? *Acc. Chem. Res.* **38:** 542–548.

———.2006. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3:** 891–893.

Rasnik I., Myong S., Cheng W., Lohman T.M., and Ha T. 2004. DNA-binding orientation and domain conformation of the *E. coli* Rep helicase monomer bound to a partial duplex junc-

tion: Single-molecule studies of fluorescently labeled enzymes. *J. Mol. Biol.* **336:** 395–408.
Schatz P.J. 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: A 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli. Biotechnology* **11:** 1138–1143.
Selvin P.R. 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Struct. Biol.* **7:** 730–734.
Tan E., Wilson T.J., Nahas M.K., Clegg R.M., Lilley D.M., and Ha T. 2003. A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 9308–9313.
Weiss S. 1999. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* **283:** 1676–1683.
Zhuang X. 2005. Single-molecule RNA science. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34:** 399–414.
Zhuang X., Kim H., Pereira M.J.B., Babcock H.P., Walter N.G., and Chu S. 2002. Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* **296:** 1473–1476.
Zhuang X.W., Bartley L.E., Babcock H.P., Russell R., Ha T.J., Herschlag D., and Chu S. 2000. A single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science* **288:** 2048–2051.

（邱　爽　译）

# 第3章　在体和离体条件下用单纳米精度的荧光成像技术观察分子马达的步行

**Paul R. Selvin　Tyler Lougheed　MelindaTonks Hoffman　Hyokeun Park**
**Hamza Balci　Benjamin H. Blehm　Erdal Toprak**

Biophysics Center and Physics Department, University of Illinois,
Urbana, Illinois 61801

## 摘要

单纳米精度的荧光成像（fluorescence imaging with one-nanometer accuracy，FIONA）是一种对一个染料分子或一组同一染料分子在1 nm精度内进行定位的技术。这种高精度是通过组合全内反射荧光显微镜、脱氧试剂和一种高量子场低噪声的检测剂等来实现的。目前有几种不同形式的FIONA，一些方法的分辨率小于10 nm。其中一种称为光漂白的单分子高分辨率成像（single-molecule high-resolution imaging with photobleaching，SHRIMP）技术，这种技术只需要一种染料，如两个绿荧光蛋白或者两个罗丹明分子。但是，SHRIMP只能在静态下获得高分辨率。另外，单分子高分辨率共定位（single-molecule high-resolution colocalization，SHREC）也是一种FIONA，它具有动态系统的高分辨率能力。还有散焦定向和定位成像（defocused orientation and positional imaging，DOPI）能进行三维定向，并通过自身或者与FIONA组合能将染料结合分子定位在几纳米之内。最后一种是具有单纳米精度的明场成像（bright-field imaging with one-nanometer accuracy，bFIONA），这是运用明场显微镜获得时间和光谱定位的FIONA，从而能避免使用荧光。

## 概述

单纳米精度的荧光成像（FIONA）是一种在 $x$-$y$ 平面内实现单个或者单组荧光团纳米精度范围内定位的简便方法。假设在实验的时间分辨率内荧光团每秒发射数量为5000～10 000个光子，那么FIONA能达到1～2 nm的精度范围（Yildiz et al. 2003）。我们已经达到的时间分辨率范围为1～500 ms（Yildiz et al. 2003；Kural et al. 2005）。通过加入阻止快速光漂白的各种不同试剂，记录一组动态成像能追踪单分子的运动，持续时间最长达到4 min。

各种FIONA技术能用于分辨距离在10 nm之内的两个染料（Gordon et al. 2004；Qu et al. 2004）。分辨率代表两个荧光团能被彼此鉴别的距离，正常情况下可见光的远场极限大约是250 nm。光漂白的单分子高分辨率成像（SHRIMP）能分辨在同一个样本里紧密接触的两种不同染料。它是通过激发光照射两种染料，直到其中一个染料被漂白，并用FIONA来确定另一个染料的位置。然后，通过减去在漂白前成像的两个染料中没有被漂白的染料来确定被光漂白的染料位置。最后拟合出光漂白荧光团的成像，在

纳米精度范围内确定每个染料的位置。

运用 FIONA 技术，不仅能互相定位两种不同颜色的荧光团，而且与标准远场衍射极限相比，测定的荧光团之间距离具有更高的精度（Lacoste et al. 2000；Churchman et al. 2005；A. Yildiz et al. 未发表）。例如，一种叫 SHREC 的单分子高分辨率共定位技术，能被单独运用于每种染料，获得一个小于 10 nm 的分辨率。这种技术适用于任意时间尺度并且能够观察亚衍射限度行为，从而能获得横跨于荧光共振能量转移（FRET，1～10 nm）和标准显微镜（>300 nm）之间的测量距离。

FIONA 技术除了能确定荧光团的中心点，还能观察到染料的三维定向。通过移动物镜至聚焦点以外 100～500 nm 处，散焦成像显示出一种依赖染料方向的特征样式。例如，正常情况下垂直方向的染料将不会被激发，因为入射光的电场在 $x$-$y$ 层面。然而，当使用高数量的样品时，光的极性有一个明显的 $z$ 组分，出现一种环形图像，似乎中心是暗的（正好在 $z$ 轴），而外围是亮的。利用这种方式，所有平面角的方位能被确定在大约 15°以内（Toprak et al. 2006）。

本章提供了一个 FIONA 技术的小结，简单地描述一些运用这些技术进行研究的例子。还叙述了关于 FIONA 技术的实验细节，包括设备的要求，安装和光学校准，各种实验的标准方案以及数据分析。

## FIONA 的工作原理

关于 FIONA 的基本思路见图 3-1。简言之，在玻片上放一个荧光团并用全内反射进行激发。尽管有其他合适的方法用于激发荧光团，但全内反射只要求一个小的荧光团体积，背景荧光要比其他方法低得多（Yildiz et al. 2003）。运用电耦合摄影仪（CCD）进行宽场检测，或者可以用电倍增电耦合摄影装置（EMCCD）采集荧光，按照 $x$ 和 $y$ 方程式对应强度进行作图。Thompson 等（2002）已经证实近似定位等于点面函数的宽度（对于可见光来说，它只有大约 250 nm 的宽场衍射极限）除以光子总数的平方根。如果有 5000～10 000 个集束光子，那么计算结果为（2.5±1.25）nm。尽管在实际情况下这些变量通常非常小，使得限制因素主要是荧光团发射的光子数（$N$），同时还需考虑检测器和背景噪声等变量，如公式 1 所示。在公式 1 中，位置精度（$\sigma_\mu$）（即不确定度或者平均标准误）与图像检测器的像素尺寸（$a$）、背景标准差（$b$，包括背景荧光和检测器噪声）和分布宽度（标准差，$s_i$，$i$ 表示方向，这里 $i=x$ 或 $i=y$）有关（Thompson et al. 2002）。根据测量步移前后位置，可以确定步移的尺度。

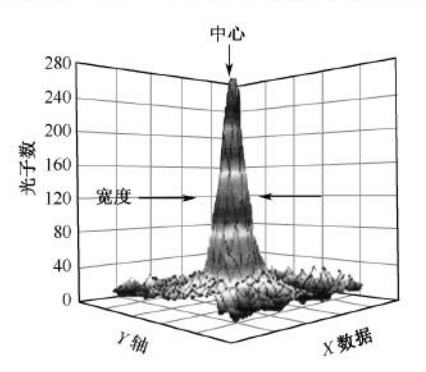



图 3-1 单个 Cy3 分子的 CCD 成像示意图。成像的宽度大约是 250 nm，但中心位置定位在 $w/(S/N)$ 之内，$S/N$ 是信噪比（公式 1）。当信噪比接近 $N$，$N$ 是指光子的总数。当 $N=10^4$ 时，中心的测量误差范围为±1.3 nm。

$$\sigma_{\mu_i} = \sqrt{\left(\frac{s_i^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}\right)} \tag{1}$$

公式中的第一项是光子噪声，第二项是检测器限定像素尺寸的影响，第三项是背景的影响。

像素尺寸等同于 CCD 的像素除以总的放大倍数。当推荐的使用范围为 80～120 nm/像素时，足够数量的光子发射能产生 1～2 nm 的标准误（Enderlein et al. 2006）。由于运用全内反射的背景非常小，加上背面很薄的 EMCCD，来自摄像仪的噪声可以忽略不计。

## 体外系统运用 FIONA 分析肌球蛋白 V 的运动

我们的结果已经显示，肌球蛋白 V、肌球蛋白 VI 和驱动蛋白都是以"手握手"(hand over hand) 行走，而不是尺蠖式 (inchword) 的运动 (Yildiz et al. 2003, 2004a, b)。肌球蛋白 V 是一个二聚体（图 3-2A）。每个肌球蛋白 V 单体都含有一个头部（也叫"手"）、一个颈部和一个杆部。头部主要结合肌动蛋白和水解 ATP；颈部含 6

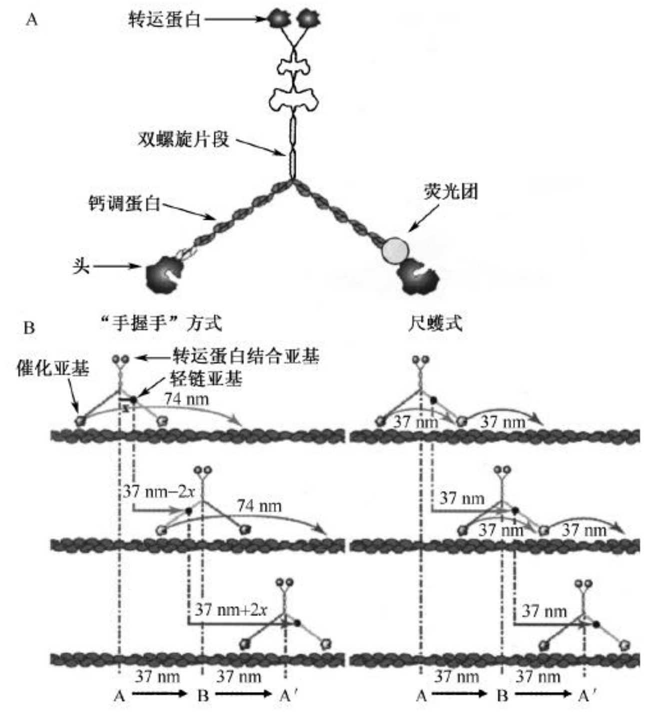



图 3-2　A. 肌球蛋白 V 的结构。二聚体的半个结构由一个头部、含有 6 个钙调素的轻链、一个卷曲螺旋和一个底物结合区组成。我们将一个荧光团标记的钙调素替换到肌球蛋白 V 上。B. 通过计算步移的样式能确定标记的钙调素的精确位置。如果肌球蛋白的行进是一种"手握手"的方式，那么肌球蛋白的步移范围分别为 61～13 nm、52～23 nm、43～21 nm 等。以此类推，步移范围主要与哪个位置的钙调素被替换有关。如果行进是一种尺蠖方式，那么步移距离均为 37 nm。我们的实验结果显示是一种"手握手"的方式（图 3-3）。

个重复的钙调素结合共感序列（IQ 区）；杆部使得单体握在一起并且促进与底物的结合。众所周知，肌球蛋白 V 运输底物的步移是 36 nm（Mehta et al. 1999）。如果肌球蛋白按照“手握手”方式行走，当一只“手”越过另一只手，这只手要移动 72 nm 步移，而另一只“手”保持不动（图 3-2B）。如果一个荧光标记的钙调素结合到肌球蛋白 V，那么染料的运动是（36－2 $x$）nm，$x$ 是到质量中心（也即是杆部）的距离，随后按照（36＋$x$）nm 距离运动。为了使这些步移成像，要将 GFP 结合到头部（Snyder et al. 2004），钙调素则用罗丹明标记（Yildiz et al. 2003）。

图 3-3A 根据位置和相对时间进行作图，用罗丹明标记的钙调素对几个肌球蛋白 V 分子进行示踪。结果显示平均步移是 74 nm，是质心的 2 倍。因此，肌球蛋白 V 按照“手握手”的方式进行运动。通过降低 ATP 浓度来减慢步移的速率，我们获得了更高的分辨率，并且发现肌球蛋白实际上按照 64 nm 和 10 nm 两种步移行走（缩写为 64-

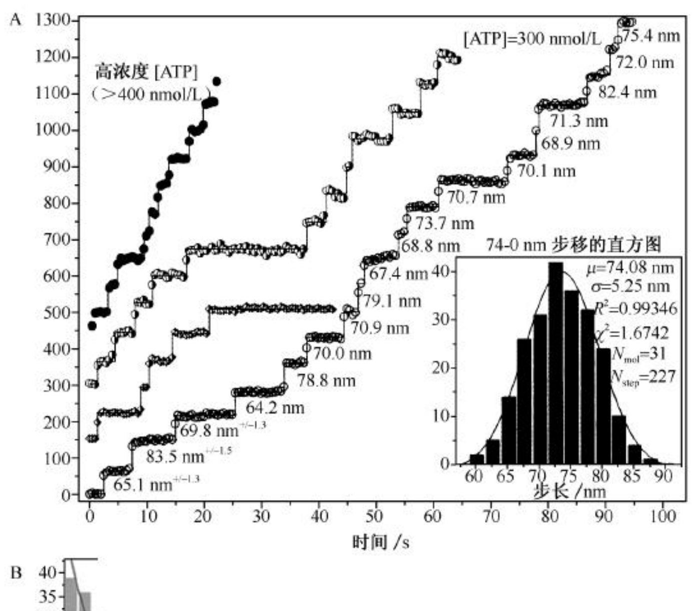



图 3-3 肌球蛋白 V 的步移样式。A. 这些步移的直方图显示单个轨迹，平均步移尺度是（74.1±5.25）nm（插图）。注意到每个步移的标准差是 1.3～1.5 nm，表明肌球蛋白的行进具有不同尺度的步移。B. 两个不同标记的肌球蛋白的停留时间直方图。如果标记物接近肌球蛋白的杆部中心，那么每步步移导致的标记分子移动为 33～42 nm，23～52 nm，…。这样会产生一个指数停留时间直方图。此外，如果标记的钙调素接近头部，（74-0 nm），那么随着步移可以得到一个 $te^{-t}$ 直方图，如预期的一样符合“手握手”模型。

10 nm 步移）(Syed et al. 2006)。图 3-3B 显示肌球蛋白 V 步移数对应步移之间时程的直方图。如果标记的钙调素结合到一个接近杆部的 IQ 区，一个单指数结果如下，因为每一个步移时染料都朝前运动（36－2x nm，36＋2x nm），如 32-43nm、23-52nm（也见图 3-2B）。然而，如果最靠近头部的钙调素被交换，对于“手握手”的方式，绘制的图就像 $te^{-kt}$ 公式图像，因为染料只会做一步式的运动（只要染料不动这就是严格的事实，如假设染料在头部而不是在颈部；Syed et al. 2006）。在短的时间范围内波形趋向于零；在更长的时间范围波形会随着指数衰减（Yildiz et al. 2003）。

## 运用 SHRIMP 分析肌球蛋白 VI 运动

如之前所提到的，SHRIMP 是一种成像两个染料距离的方法，它们的距离要比衍射极限更近（10～100 nm）(Gordon et al. 2004)。例如，把荧光团放到肌球蛋白 VI 的每个头部，并且把运动蛋白附着在肌动蛋白上，处于近似僵直的状态时，当距离位于步移之间时能够测量一个肌球蛋白 VI 分子不同头部之间的距离。在我们的试验系统，鉴别在二步法（图 3-4A）光漂白中的肌球蛋白 VI 分子，然后拟合各个点（图 3-4B），得到两个头部之间的距离为（29.3±1.4）nm，这是与“手握手”模型相一致的。这些结果也表明在步移时头部之间有一个相对稳定的距离，并不是一个可变的步移距离，60－x，x（这里 x 可能明显不同于 30 nm）[要了解“手握手”方式的细节详见 Balci 等(2005)]。已经报道了一种类似的技术，命名为纳米定位的多道单分子（NALMS）荧光显微镜（Qu et al. 2004）。

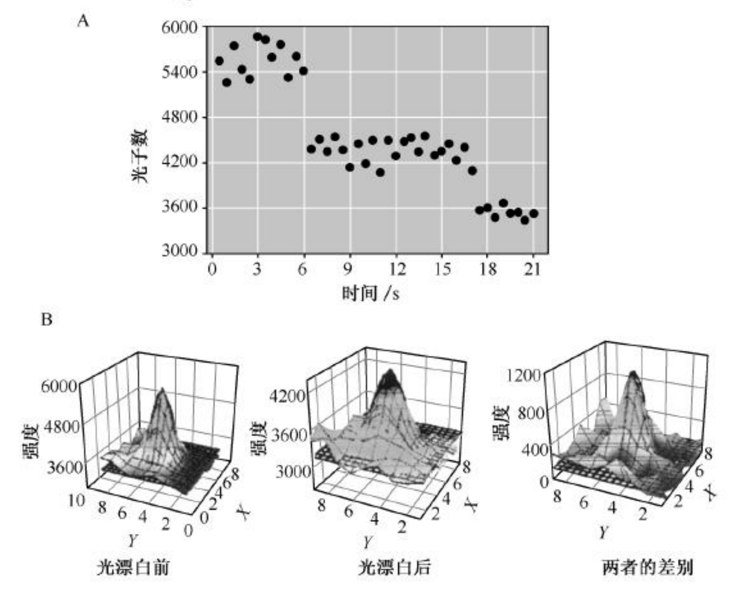



图 3-4 SHRIMP。A. 显示来自于单个斑点的不同时间的光子数。可以看到存在一个两步漂白。B. 一个拟合数据的实例。漂白前对两个染料进行拟合，经过漂白处理后使得一个染料被漂白，并对没有漂白的荧光染料进行拟合，从而可以测得这个染料的图心。随后，计算在两个拟合之间的差别就可以得到漂白的染料的图心。

## 运用 SHREC 技术精确定位两个分子间距离

FIONA 能应用于两种不同颜色的荧光团。通过同步分析每个染料的位置，能将它们的位置精确到纳米水平。因此，能将染料之间的距离计算到同一精度水平。例如，Spudich 小组所证实（Spudich 命名了这项技术），SHREC 允许测量的荧光团之间距离大约在 10 nm 分辨率范围，这显著低于 Rayleigh 的远场衍射极限（Churchman et al. 2005）。图 3-5 是一个肌球蛋白 V 被 Cy3 和 Cy5 标记的例子，这两个染料之间的距离是 8 nm（见第 4 章）。

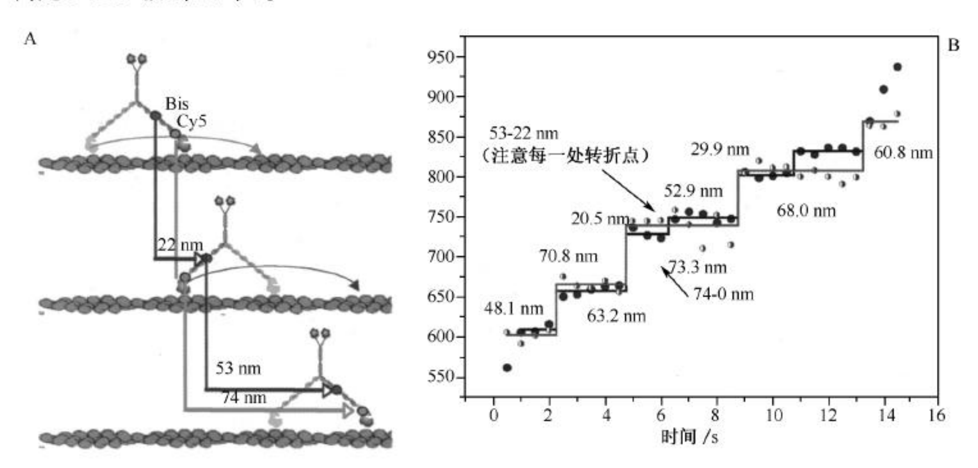



图 3-5　A. 用双罗丹明或 Cy5 荧光团标记钙调素并随机交换到肌球蛋白 V 中。产生各种不同的步移距离。A 图和 B 图都显示了一个实例，一个双罗丹明标记的蛋白质的行进按照 22-53 nm 的步距，而 Cy5 标记的蛋白质则是 74-0 nm 的步距。

## 运用在体 FIONA 研究过氧化物酶体运输

在体 FIONA 的主要难点是要找到能使荧光团发射足够数量光子的条件（公式 1）。尽管目前获得量子点适合的结合特异性仍然是个难题，但量子点和几组荧光团［串珠或者簇状的绿荧光蛋白（GFP）］都能持续发光（Michalet et al. 2005）。我们研究了充满大量 GFP 的过氧化物酶体，通过运用拉春库林（latrunculin——来自红海棉 *Latrinculia magnifica* 的高毒大环内酯）处理果蝇 S2 细胞来解聚肌动蛋白，产生大量的过氧化物酶体，发现一个微管蛋白沿着它们的整个长度行走（图 3-6A）。微管的正性末端定位在过氧化物酶体的末端，而负性末端定位在接近核的位置。同时注意到驱动蛋白朝着正性末端方向运动，而动力蛋白朝着负性末端方向运动。我们设计了一个实验来检测底物的运输是通过一种驱动蛋白和动力蛋白协同运动的方式，还是通过两者之间“你死我活”（slug-fest）的竞争方式。与大多数底物一样，过氧化物酶体由驱动蛋白和动力蛋白运输，它的前向或者后向运动似乎是一种随机的方式。“你死我活”方式要求两个动力蛋白都拉底物，并且更强的一方将赢得胜利。而一种协同的运动显示驱动蛋白或者动力蛋白移动底物并没有受到一个反向马达蛋白的拖动力影响。因此，在协同移动过程

中，必定有一个细胞信号引导驱动蛋白和动力蛋白在恰当的时间释放和再结合到微管或者底物上。

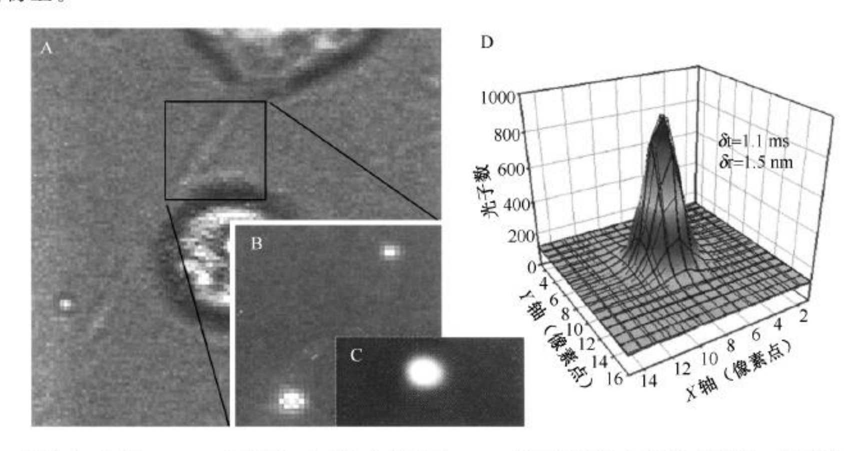



图 3-6　在体 FIONA 在果蝇 S2 细胞中的实验。A. 是单个细胞的明场成像图，拉春库林处理引起肌动蛋白解聚以及突起的生长，其中有一个位于黑盒之内。突起沿着微管的长度行走。驱动蛋白拖着过氧化物酶体远离细胞方向行走，而动力蛋白则向着细胞行走。B. 是一张荧光显微镜显示 GFP 标记的底物照片，可以看到有两个 GFP 标记的底物。注意到 GFP 标记的底物非常亮，因为它含有大量的荧光团（C）。由于多个 GFP 分子是非常亮的，使得我们在获得非常好的时间分辨率（1.1 ms）的同时，仍然可以得到极佳的空间分辨率（1.5 nm）（D）。

图 3-6A 是一幅明场成像图，显示一个已经用拉春库林处理过的果蝇 S2 细胞，这是为了诱导产生过氧化物酶体。荧光照片（图 3-6B）显示了过程中的两个亮点。定量图片显示一个斑点的亮度（图 3-6C）。如果对这个点进行先前所说的曲线拟合（图 3-1），则这个点在 1.1 ms 曝光时间内有大约 5000 个光子（图 3-6D），并且拟合后具有 1.5 nm 的偏差。这比体外系统实验的时间分辨率要增加将近 500 倍。

我们已经分析了单个过氧化物酶体在果蝇 S2 细胞中的移动，并且发现能够分辨驱动蛋白和动力蛋白的单个步移（图 3-7A，B）。同时，也能观察到驱动蛋白和动力蛋白之间的转换（图 3-7C）。驱动蛋白和动力蛋白步移的直方图显示，两个阶梯样直方图的中心距离大约为 8 nm，驱动蛋白和动力蛋白轨迹的成对位移直方图同样显示两个运动蛋白都有 8 nm 的宽度（图 3-7E）。如果驱动蛋白和动力蛋白是彼此竞争的关系，那么预示应该是一种非对称分布模式，即多数的宽度小于 8 nm，少部分的宽度则大于 8 nm。如图 3-7F 所示，驱动蛋白行走时，一个臂要用 16 nm 宽度，但是由于有限的顺应性（1 pN/nm），底物的运动要低于 8 nm（图 3-7F 示 4 nm）。因此，我们认为运动必定是协同作用并且涉及一些未知的调节者。

## 运用在体 bFIONA 能定位色素物质

单纳米精度的明场成像技术是基于 FIONA 的细微改变，它不需要荧光，而是用透射光成像致密物体（Kural et al. 2007）。一种调节明场聚光器很适合应用于这种技术，

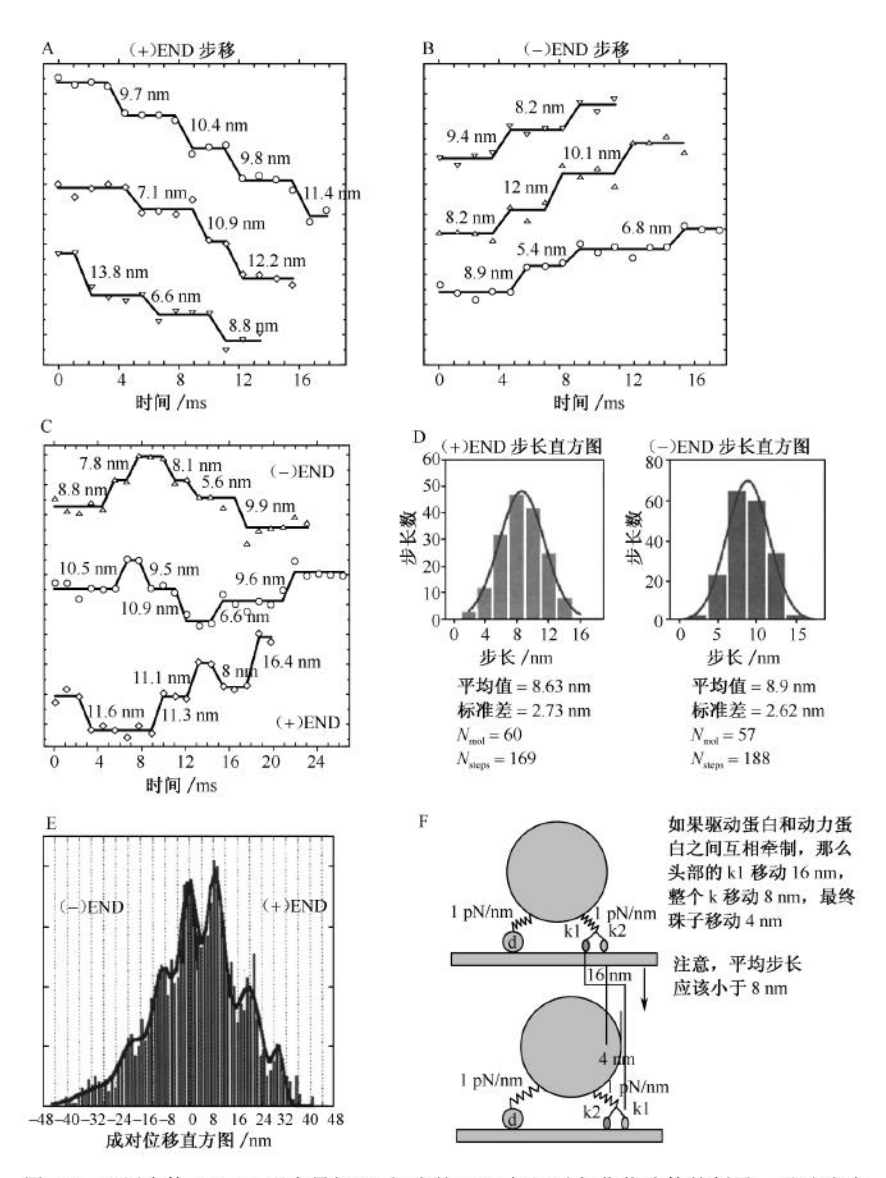



图 3-7　运用在体 FIONA 观察果蝇 S2 细胞的 GFP 标记过氧化物酶体的例子。通过追踪过氧化物酶体的运动，在毫秒级时间分辨率范围内解析单个驱动蛋白（A）和动力蛋白（B）的各种步移。C. 在驱动蛋白驱使的运动和动力蛋白驱使的运动之间转换。D. 正向和负向主导步移的直方图，得到一个近似 8 nm 的均值，这是预期的驱动蛋白和动力蛋白的步长。E. 成对位移直方图，显示的最大值位于 0 nm 和 8 nm 的倍数，体外系统再次显示驱动蛋白和动力蛋白的平均步长是相同的。F. 一个模式示意图，驱动蛋白和动力蛋白彼此反向推动底物的运动。注意在这个模型中平均步长应该小于 8 nm。

其每个光点的成像强度都是翻转式的（减去一个常数），经常规拟合作成反转图片（图 3-8A～C，见图版）。图 3-8C 显示一个黑色素体（一种含有黑色素的暗物质）大约定位在图心的 2.4 nm 区域。我们已经运用 bFIONA 证明，当一个固定的黑色素体被移动 8 nm/1.1 ms 时，位移能被非常精准地测量（Kural et al. 2007），同时还能测量出驱动蛋白 II 和动力蛋白的位移（图 3-8D）。进而，图 3-8E 显示一个黑色素体先被肌球蛋白运载，然后再被驱动蛋白运载，反之亦然，并没有明显的扩布样行走。这提示肌球蛋白能够把黑色素体从微管扯开，反之亦然，或者有一些协同步骤，在接收到一个信号之后肌球蛋白（或者驱动蛋白）就能操控底物（Kural et al. 2007）。由于 bFIONA 所需的设备十分简单而且不需要光漂白，使得人们能够长时间观察一个样本。

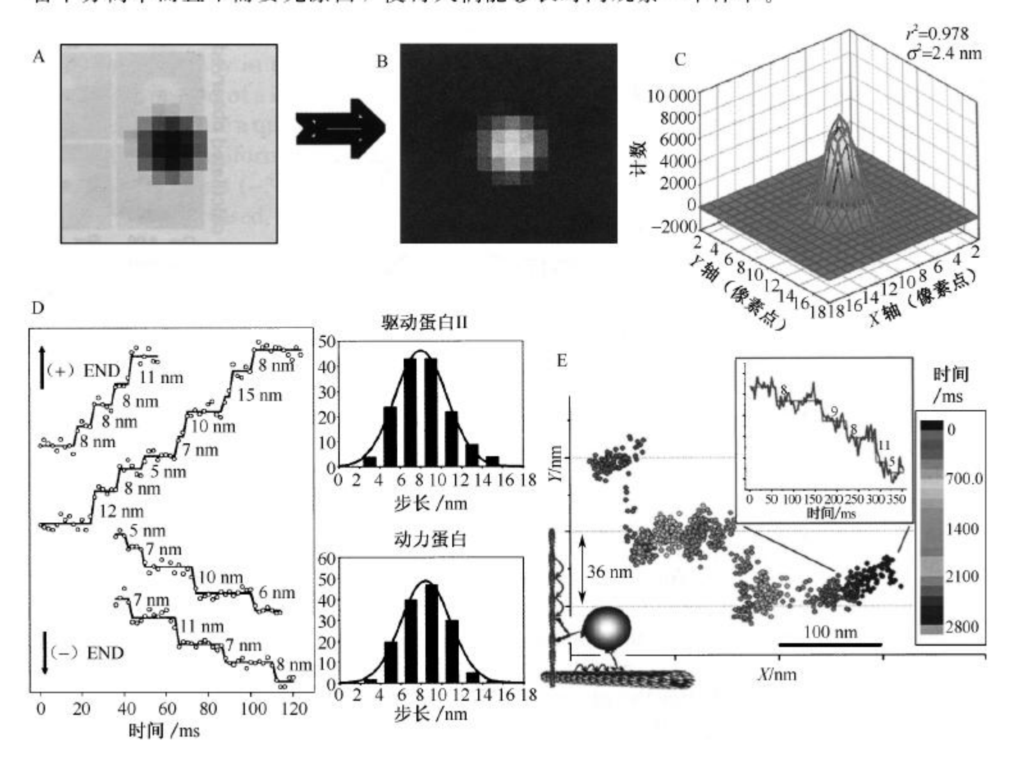



图 3-8　明场 FIONA。A. 一个黑色素体的明场成像图。注意到黑色素体要比周围的背景具有更低的光子数；B. 为了拟合成高斯曲线，黑色素体图像被倒转；C. 一幅高斯拟合的倒转黑色素体图像，图心定位在 2.4 nm；D. 通过对黑色素体运动成像来显示驱动蛋白和动力蛋白的步移轨迹，右侧是一个驱动蛋白和动力蛋白步长的直方图；E. 单个步移轨迹显示黑色素体先有一个 36 nm 的步移随后接一个 8 nm 的步移，这意味着黑色素体先是由肌球蛋白介导的运动，随后切换到由驱动蛋白和动力蛋白介导的运动。

## 散焦定向和定位成像

虽然定位单个荧光团能用于测量纳米范围的转位，而单个荧光团的偶极跃迁力矩则能用来测量感兴趣分子的旋转运动。目前大多数用于测量单个染料三维定向的方法是利用染

料的偏振特性。然而，运用偏振调制来确定单个荧光团的平面角度或者分析单个荧光团发射光的偏振，通常有一些角简并的问题。我们偏爱的这个技术，即散焦定向和定位成像（DOPI），是基于 Bartko 和 Dickson 的工作之上的（1999）。DOPI 能被用于揭示单个荧光团的三维定位以及将荧光团的图心定位到亚像素分辨率。关于 DOPI 的理论和计算背景在 Enderlein 等的文章中有详细的描述（Bohmer and Enderlein 2003; Patra and Enderlein 2004）。

不同于大多数传统的显微镜技术，运用 DOPI 技术获得各种荧光团的图像是样本面处在离开物镜清晰焦平面的不同高度，这个值叫做 $\partial z$。由于 CCD 的荧光团图像产生于光子聚焦到单个固定焦点之前或者之后，每个 CCD（像素化）成像点的图像含有偶极子辐射的信息。$\partial z$ 值与实验的光学参数有关，如荧光团液相环境的折射系数、浸入液、发射波长、物镜的数值孔径（NA）和有效像素尺寸。图 3-9 显示一个量子点的离焦图像例子（QSC55，分子探针）。图 3-9B1 是一个偶极校准到近似与光轴平行的照片示例（垂直于样本面）。结果表现为一个环形的样式。当偶极子平行于样本面时，显示的是两个对称的亮裂片（图 3-9B3）。由于没有沿着偶极轴的发射光，两个裂片之间出现一条暗“线”。这样就能通过观察这条暗线来预测入面角（Φ; 图 3-9A）。一个具有任意面外角的染料（图 3-9B2）均会形成一个“小精灵样”（Pac-Man shaped）的图像，它是图 3-9 的 B1 和 B3 的混合物。

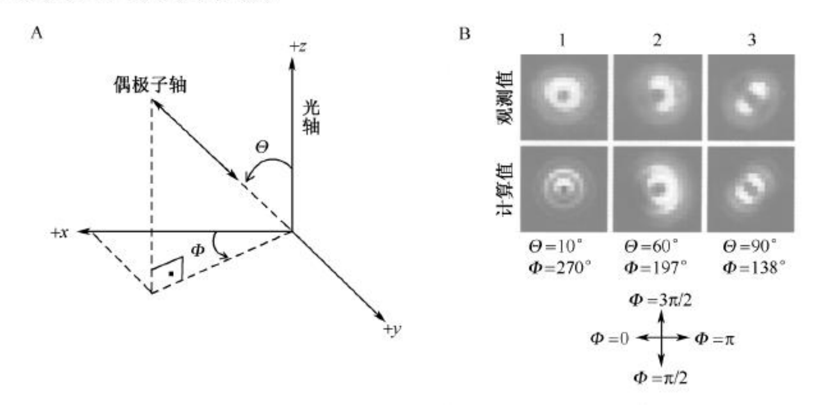



图 3-9　DOPI 的示意图。A. Φ，θ 角的定义；B. 单个量子点的离焦成像图，B1 显示的是沿着 $z$ 轴方向的成像结果，B3 显示的是在 $x$-$y$ 平面的图像，B2 是对应于 $z$ 轴成 60°角的成像图。

DOPI 的主要优点是几个分子可以同时成像，而且没有角度简并现象。DOPI 的时间分辨率对于传统荧光体（如罗丹明或 D; I）约为 0.5 s，对于量子原子团约为 0.05 s。

## 如何运用 DOPI

图 3-9 的图像是一个量子点的 DOPI 实验。然而，运用荧光团进行 DOPI 实验会遇到更多的问题，由于它既不如量子点明亮，光稳定性也不如量子点。此外，运用荧光团的信噪比（SNR）会更低，因为图像被模糊了而且散焦使图像变得更大了。克服这些问题的关键在于用高激光能量激发荧光团，然后在不漂白荧光团的情况下聚合尽可能多的光子。克服这些问题的措施小结为以下 4 个步骤。

1. 通过使用一些特殊的成像缓冲器来增加聚集的光子数量和荧光团的稳定性（实验方案 4）。
2. 运用全内反射激发荧光团。全内反射明显增加信噪比是因为只有一小部分被逝场激发。小心选择激发的激光偏振和剖面。重要的是，要用最小的激发强度在光照区内均匀激发所有的分子。我们完成这个实验依靠一个圆形的偏振激光取代线性的偏振激光。既然大多数仪器商都生产线性的偏振激光，我们使用了一个 1/4 波片（thorlab）来改变偏振。通过尽可能扩大光束和使用短焦距全内反射镜片（约 30 cm 焦距）的方法形成均匀的光照区。在我们的多数实验中，使用 3～4 mW 的激发强度，它能在激发光进入显微镜的光孔之前被准确测量。
3. 运用小的有效像素范围（CCD 的单元尺寸/放大倍数）和非常敏感的 CCD 采集器。我们使用的有效像素范围大约是 100 nm。CCD 有一个 16 μm 的单元尺寸以及总的放大倍率是 160×（100×物镜+1.6×的显示器的放大单元）。最好避免使用额外的光学来放大图像，因为这会增加光子的损失并引起成像系统的额外偏差。如果使用新一代的具有更小单元尺寸的 CCD 摄影仪（Hamamatsu-Orca 有一个 6.45 μm 的单元尺寸）以及一个 60×或者 100×物镜，就有可能获得低于 100 nm 的有效像素范围。理论上，用更小像素进行样本成像对于图像分析是有用的。然而，每个像素的亮度（光子数/放大倍率$^2$）会因为放大倍率而下降，从而信噪比会明显减小。如果不用考虑快速获取图像的话，一种简便的增加信噪比的方式就是增加曝光时间。
4. 选择适当的物镜。这是进行 DOPI 实验需要考虑的事情。物镜要有高的聚光效率（效率约等于 $NA^2/n_{oil}^2$），能与全内反射显微镜相匹配（NA＞1.40），以及具有高放大倍数（60×或者 100×）。然而，使用高数值孔径的物镜会带来球面像差的风险，这可能导致异常的散焦成像。理论上讲，无论样本是朝着物镜移动还是远离物镜，单个荧光团的发射应当会产生结构性的散焦图像（依据它的三维定向和散焦的数值）。在实验室我们发现每个物镜有它自己的特性，所以必须逐个进行评估。例如，尽管我们都用同一种 100×1.45 NA 油镜（Olympus，PlanApo 100×1.45NA，∞/0.17），但是在 5 个 100×1.45 NA 油镜中只有两个能产生很好的散焦图像。我们也能用一个 1.65 NA 的物镜（Olympus，Apo 100×1.65NA，∞/0.15）和 1.40 NA 的物镜（Olympus，PlanApo 100×1.40 NA，∞/0.17）获得很好的图像。我们曾经短时间使用过一个 Nikon 物镜（NA=1.49），似乎它也能很好地工作。最后，我们注意到这些物镜只能在一个方向上很好地成像，要么在样本朝物镜移动的方向，要么朝向远离物镜的方向，但对于任何特殊的物镜都不会在两个方向同步获得很好的图像。令人惊讶的是，即使两个物镜具有同样的模式数目，它们的表现也并不相同。

## 初始 DOPI 的实验训练

一种压电式 $z$ 轴工作台（如 Nano Z-100，MadcityLabs，Wisconsin），允许操控样本的散焦。一种方法是找到最佳焦平面（如果使用全内反射显微镜，当聚焦样本时，应该也能看到来自于玻片-水分界面的背面反射束），然后散焦样本直到观察到十分好的结构性散焦图像为止。在我们系统中，散焦数值约为 500 nm [160×放大倍数，$n$=1.333]。散焦数值与放大倍数$^2$×$n$成正比，$n$是荧光团周围介质的折射系数。

在我们最初的练习实验中，我们对 DiI 分子（溶于甲醇，大约 1 nmol/L）进行成像。于 3000 r/min 离心 30 s 将 DiI 分子沉淀，然后成像前在 100℃风干 2～3 min。要注意进行足够的练习，对于初始训练而言，并不需要压电工作台。通过手动调节精细的聚焦旋钮范围，能够很容易观察到散焦成像。

## 利用 DOPI 进行单分子生物物理学研究

DOPI 首先用于研究多聚体中染料的旋转动力学（Bartko and Dickson 1999）。在作者研究肌球蛋白 V 的实验之前，DOPI 一直没有被用于生物学研究（Toprak et

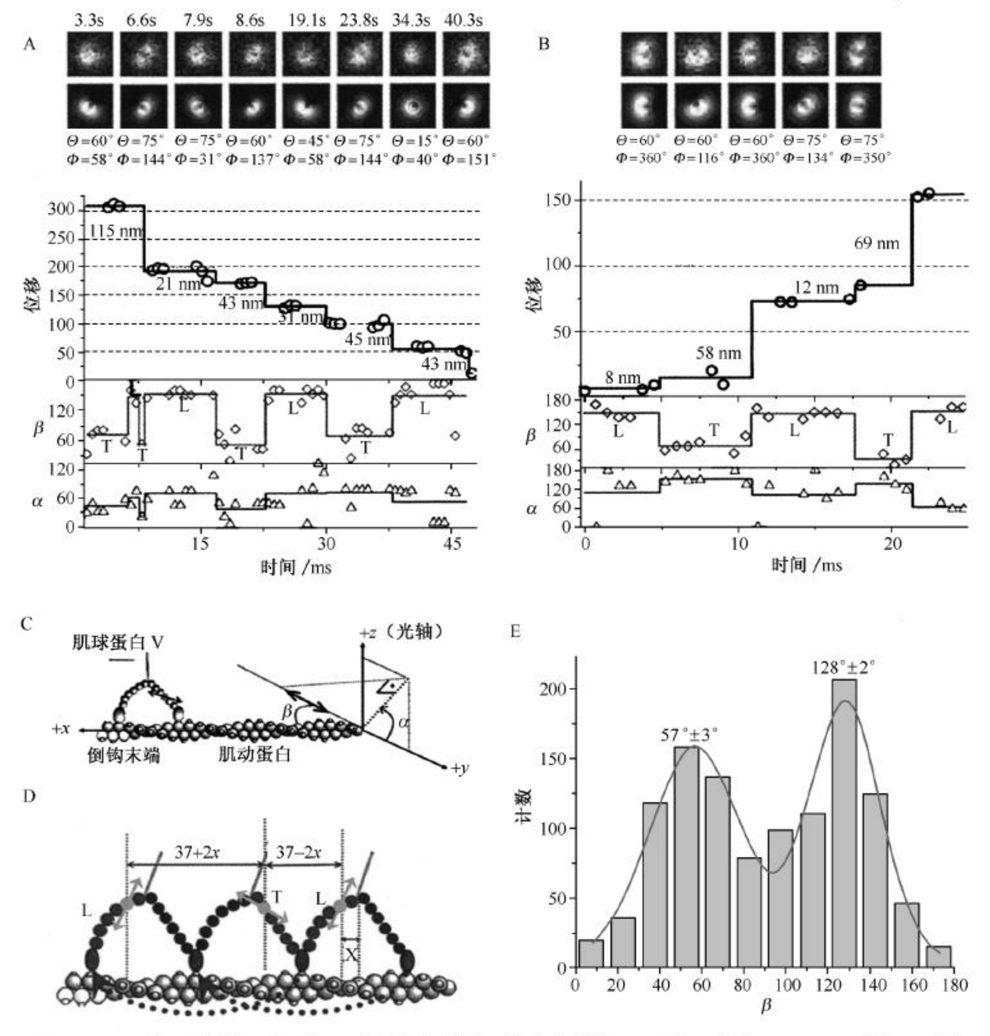



图 3-10　两个不同的肌球蛋白 V 分子的位移和三维定向结果。A 图显示约 44-30 nm 步移，B 图显示约 64-10 nm 步移。A 和 B 上方图片显示了 DOPI 的方向；图心的转换（即 FIONA）用黑色进行作图，α 和 β 的数值（即 DOPI）分别位于图的下方和中间。C 图显示了对 α 和 β 的定义。肌球蛋白 V 上的染料的方向在 57°和 128°角度之间波动，见图 D 和图 E。

al. 2006)。肌球蛋白 V 是一个二聚化蛋白，具有两个力臂，每个力臂能结合 6 个钙调素分子。每个肌球蛋白 V 上的一个钙调素被双功能的罗丹明（BR）共价交联到钙调素的 66 位和 73 位半胱氨酸上进行标记。将染料附着在两个位置上，使其定向并阻止染料的随机摆动。图 3-10C，D 显示了预测的染料-肌球蛋白-肌动蛋白的几何学关系。球面坐标测得的所有角度被转化成以肌动蛋白为基础建立的坐标系统，α表示环绕肌动蛋白的方位角，β表示关于肌动蛋白轴的轴角。

在我们对肌球蛋白 V 的研究中，获取图像一般的曝光时间为 0.6～0.8s。因为 DOPI 的定位精度并不如 FIONA，为了捕获罗丹明分子的三维定向和精确定位肌球蛋白 V 的步移，我们时常要在聚焦和散焦成像之间进行切换。图 3-10A，B 显示了如上所述对肌球蛋白 V 成像的样本轨迹。利用位置和信息数据，我们能够区别肌球蛋白 V 力臂的延伸和引导状态。β 值总是在两个明确的角度之间波动。在 97 个样本的 1151 次步移事件中，延伸状态的平均值为 57°±22°，对于引导状态则为 128°±17°（图 3-10E）。所测得的力臂扭矩为 71°，与之前的电镜结果十分一致（Burgess et al. 2002）。

## 数据拟合：隐马尔可夫模型和 *t* 检验方法

对实验轨迹的最简单的数据拟合方法是用眼睛（即利用看似平滑的数据点，拟合出一条贯穿这个区域的线，然后测量两个步移之间的距离）。这种简单但却粗糙的方法容易产生人为的偏差，因此，最好利用一个没有偏差的方法拟合步移，如 *t* 检验或者隐马尔可夫模型（HMM）。一些关于 HMM 技术方面的文献是可以查阅的（Milescu et al. 2006a，b）。更多有关这些方法的用户界面友好的软件版本尚未发表（S. Syed et al.，in prep.）。如想获得这种用户界面友好的软件包，请与作者联系（selvin@uiuc.edu）。

一般认为，单分子实验最适合用于捕获生物大分子行为的不均一性，而这些是传统的整体实验所不能显示的。单分子的行为受随机事件支配，因而不能推断形成固定频率的大分子的构象变化，它们需要在记录过程中被清晰地看到。许多实验经常在低信噪比情况下进行，因为探针自身是纳米尺度的，它们很难去探查和收集数据，而且还很容易受到局部环境变量的干扰。所以，很难对单分子记录进行公正分析。目前已经发展出两种方法，它们利用已被广泛接受的统计学工具来重建马达蛋白的动力学事件，否则这些事件就会被噪声掩盖。

第一种方法是基于 *t* 检验，传统上它被用于确定在两个群体均值之间的差别是否具有显著性意义。这个检验是将均值的差值（$\Delta = \langle x_1 \rangle - \langle x_2 \rangle$）与群体的变量（$\sigma_1^2$ 和 $\sigma_2^2$）相比较，得到 $t = (\langle x_1 \rangle - \langle x_2 \rangle) / \sqrt{\sigma_1^2 / N_1 + \sigma_2^2 / N_2}$，$N_1$ 和 $N_2$ 是两个群体中的数据点的数量。然后 *t* 值用于计算给定的概率阈值之内的 Δ 值。一个分子马达的记录图类似于楼梯，采集相邻位置的数据，通过应用基本的 *t* 检验，能确定马达蛋白是否在特定时间点移动了一步。然而，不同于传统的 *t* 检验，分子马达是动态系统。对于一个特定的位置与时间关系图而言，事先并不知道它的最佳分组或者最佳阈值。因此，在我们的算法里，针对不同的组对和概率阈值，我们对整个图形建立了一个拟合，并且给每对受测样本计算一个 $\chi^2$。每对样本会得到一个最低 $\chi^2$，作为整个数据集的一套最佳参数，对它

拟合的结果就被作为最佳拟合。典型地，从 2 到 10 个点来采集数据，用 0.05 和 0.01 之间的各种概率阈值来检验。变量、均值和其他量被实验误差加权（如荧光追踪实验采集的光子数的倒数），这种算法如实地揭示了动力学事件不受异常值的干扰。

对于第二种方法，由于记录噪声而不能直接观察马达蛋白的数据，需要按照离散马尔可夫事件计算。这种模型假设分子马达存在几种状态；这些状态发生之间的过渡态归因于构象变化，这能导致位置的改变。由于附加噪声的干扰，观测位置序列 $Y = y_1$，$y_2$，…，$y_T$ 会偏离真实位置。按照初始系统概率、跃迁概率和信号噪声（$\pi$、$C$ 和 $\sigma_0$）对数据进行参数化。一个似然函数被定义为 $L = P\{Y \mid \pi, C, \sigma_0\}$（即给定模型参数的观测数据概率）。这种方法的目的是通过估计参数来求出最大值 $L$。然后，运用前向-后向算法计算出 $L$ 值和最佳参数。这种算法能够迭代估计参数，并且每次迭代都确保 $L$ 值朝局部极大值增加。一旦 $L$ 值达到一个稳定数值，能通过经典的 Viterbi 算法把含有噪声的位置数据回复到无噪声状态。

两种方法的性能依赖于噪声，取决于记录过程中的噪声与最小步移（$s$）的比值。因为这些是统计方法，记录中采集的数据越多，算法就越能做的更加可靠。对于一组 500 时间点的数据，在低噪声水平（即 $\sigma_0 < s/2$），$t$ 检验和马尔可夫模型算法均能显示单个马达蛋白的动力学。然而，当 $\sigma_0$ 近似 $s/2$ 时，$t$ 检验会产生错误的结果，而数学功能更强大的马尔可夫模型方法仍然能够可靠地工作，即使噪声超过 $s$ 值。

## 光学校对

接下来的讨论倾向于针对那些对光学操作不太了解的研究者。有经验的研究者可以直接进入到实验方案部分。

### 物镜型全内反射显微镜的校准规则

建立一个物镜型全内反射显微镜（TIRFM）是相对简单的。简言之，步骤是控制一道或者多道激光束进入显微镜的一个端口，校准穿过物镜的光束，安装一些必需组件来实现样本的全内反射。虽然将这些必需光路元件拼凑在一起包含了实验误差，但随后的实验方案将帮助你有效地完成每一项任务。顺利做好这些步骤将能建起一台全内反射显微镜，它非常适合应用于 FIONA 实验和其他的单分子荧光成像。

### 计划安装设备

让我们首先用裸光学工作台和所有的相关组件（表 3-1 和表 3-2）来搭建一套功能性 FIONA 设备，如图 3-11 所示。首先，选择一个显微镜的位置。把显微镜放置在一个离工作台边缘比较合适的距离，便于舒适地使用目镜进行实验。理想情况下，首先把显微镜放在防震台的中间，这个位置最不容易受到震动干扰。其次，选择激光放置地点，并将预期的光路接入事先选好的显微镜接口。在安装任何附加光路之前设计好路线，使所有必需组件（快门、反射镜、镜片、光束括展器、滤光片和摄像机等）都能放在工作台相应的位置，并确保每个组件都有足够的空间。最后，安排显微镜接口和激光束沿着光学工作台的孔排列，在校准步骤（如当使用光圈时）时容易计算光束，并且便于迅速

**表 3-1 单分子成像所需的基本光学元件**

| 显微镜[a] | Olympus | IX70/IX71/IX81 |
|---|---|---|
| 物镜[b] | | |
| 100×（1.45 NA） | Olympus | PlanApo 100×1.45 NA，∞/0.17 |
| 60×（1.45 NA） | Olympus | PlanApo 60×1.45 NA，∞/0.17 TIRFM |
| 100×（1.65 NA） | Olympus | Apo 100×1.45 NA，∞/0.15 |
| 100×（1.49 NA） | Olympus | ApoTIR 100× |
| CCD 成像仪[c] | Andor Technology | iXonEM（DV887DCS-BV/DV887ECS-BV） |
| | Andor Technology | iXonEM +（DV897E-CS0） |
| | Andor Technology | iXonEM（DV860DCS-BV） |
| 激光器 | | |
| 绿色激发光（532 nm） | CrystaLaser | 二极管抽运固体激光器（DPSS） |
| 红色激发光（633 nm） | CrystaLaser/Melles Griot | DPPS/Helium Neon（HeNe）（25-LHP-928-249） |
| 蓝色激发光（488 nm） | Melles Griot | Argon-ion（35-LAS-450-120） |
| 反光镜、透镜、支架和立柱 | | |
| 宽带电介质镜 | ThorLabs Inc. | BB5-E02（1/2 in），BB1-E02（1 in），BB2-E02（2 in） |
| 运动镜架 | ThorLabs Inc. | K505（1/2 in），KS1（1 in），KS2（2 in） |
| 立柱夹持器 | ThorLabs Inc. | PH6-ST/M-PH1-ST/M（ST = 6 in-1 in，$M$ = 150-25mm） |
| 立柱 | ThorLabs Inc. | TR6-TR075（12 in-3/4 in）TR300/M-TR20/M（300-20mm） |
| 手动线性位移平台 | Newport Corp. | 423/433/443 系列（需要驱动器） |
| 全内反射聚焦透镜 | ThorLabs Inc. | Plano-Convex lens AR-coated |
| 光扩展器 | ThorLabs Inc. | 如 5×/10×（BE05M、BE10M） |
| 光学工作台[d] | | |
| 密闭型孔状工作台 | Newport Corp. | RS4000TM |
| 气压隔离器 | Newport Corp. | I-2000 Lab LegsTM |
| 滤光片和单色反射镜 | | |
| 中性密度滤光片 | Thorlabs Inc | ND 范围 0.1～5（NE01A-NE50A） |
| 激发光滤片 | | |
| 532 nm | Chroma | Z532/10×（Z532BP） |
| 633 nm | Chroma | Z633/10×（Z633BP） |
| 488 nm | Chroma | Z488/10×（Z488BP） |
| 反射镜 | | |
| 532 nm；Cy3 | Chroma | Q565LP（41007） |
| 633 nm；Cy5 | Chroma | Q660LP（41008） |
| 488，FITC/GFP | Chroma | Q505LP（41001） |
| 发射光滤片 | | |
| 532ex，570em（Cy3） | Chroma | HQ585/70M |
| 633ex，670em（Cy5） | Chroma | HQ690/90M |
| 488ex，520em（GFP，FITC） | Chroma | HQ525/50M |

[a] Olympus 显微镜工作台有一个可变的漂移。我们经常测试三个工作台并选择最好的一个。

[b] 我们的标准物镜是 100×，NA=1.45 的物镜，能与显微镜的 1.5 倍（IX-71）或者 1.6 倍的（IX-70）放大镜相组合。再用 16 μm 的 CCD 像素（Andor，512×512 成像仪），这样就能得到 100 nm 大小的有效像素。我们不会让像素尺寸大于 120 μm，因为这样会损失分辨率（公式 1，Enderlein et al. 2006）。我们用 100×，1.65 NA 的物镜，这种物镜需要特殊的油（$n$=1.78，Model 9999902/4113/7，Spi supplies，West Chester，Pennsylvania）和盖玻片。我们很少使用 1.40 NA 的超复消色差物镜，这是一个非常低的色差物镜。

[c] EMCCD 检测器具有一个电倍增元件的冷却型背照式 CCD，这是一种理想的检测器。背照允许量子效率接近 90%（在可见范围）。热电冷却系统（大约－70℃）减少噪声的原因，是它使得 CCD 的暗电流达到真实的零值。电倍增极易检测到极少量的光子，它足以超过成像仪的最小背景。像素尺寸（16～24 μm）是合适的，以至于 160 倍放大后能够产生一个 100～150 nm 的有效像素尺寸。这是合适的，虽然通常情况下，24 μm 像素尺寸要求在成像仪的前面放一个外接的透镜。

[d] 我们的 RS-4000 光学工作台是 4 ft×6 ft×8 in，或者 4 ft×10 ft×8 in 的台子。

**表 3-2　二色成像要求的附加元件**

| | | |
|---|---|---|
| **反射镜（激光器调准装置）** | | |
| (488 nm/532 nm) | Chroma | 505DCLP (31001) |
| (532 nm/633 nm) | Chroma | 570LP (41007a) |
| (488 nm/633 nm) | Chroma | Q505LP (41001) |
| **全内反射聚焦透镜** | Throlabs Inc. | 可视消色差双合透镜，焦距约 300 mm 或者平-凸柱面透镜 |
| **双波宽二色镜（显微镜）** | | |
| Cy3/Cy5 | Chroma | 51007 bs |
| FITC/Cy3 | Chroma | 51009 bs |
| FITC/Cy5 | Chroma | 51008 bs |
| **双视野转换器™**[a] | Optical Insights | Dual View™ |
| 校正透镜（正弯月透镜） | Melles Griot | 01LMP029（$f$=350 mm，散焦=700 nm） |
| 发射光滤片 | Chroma | （见上文） |

[a]Olympus 1.45 NA 物镜有一个明显的球差，使得 Cy3（橘色）和 Cy5（红色）不能同时聚焦。这对于 SHREC 是个问题。为了校正这些色差（见图 3-10B），需要在 Optical Insights 公司生产的双视野转换光束分光器的红色通道放置一个长焦距透镜。这个焦距取决于物镜。Optical Insights 公司提供了一份电子表格，用于确认校正不同程度的色差需要何种透镜。对于 Olympus NA=1.45 的 100×或者 60×物镜，我们用一个来自 Melles Griot 公司的透镜，型号是 01LMP029，LENS MNCS POS f350 Dia25（它的焦距为+350 mm，直径 25 mm）。

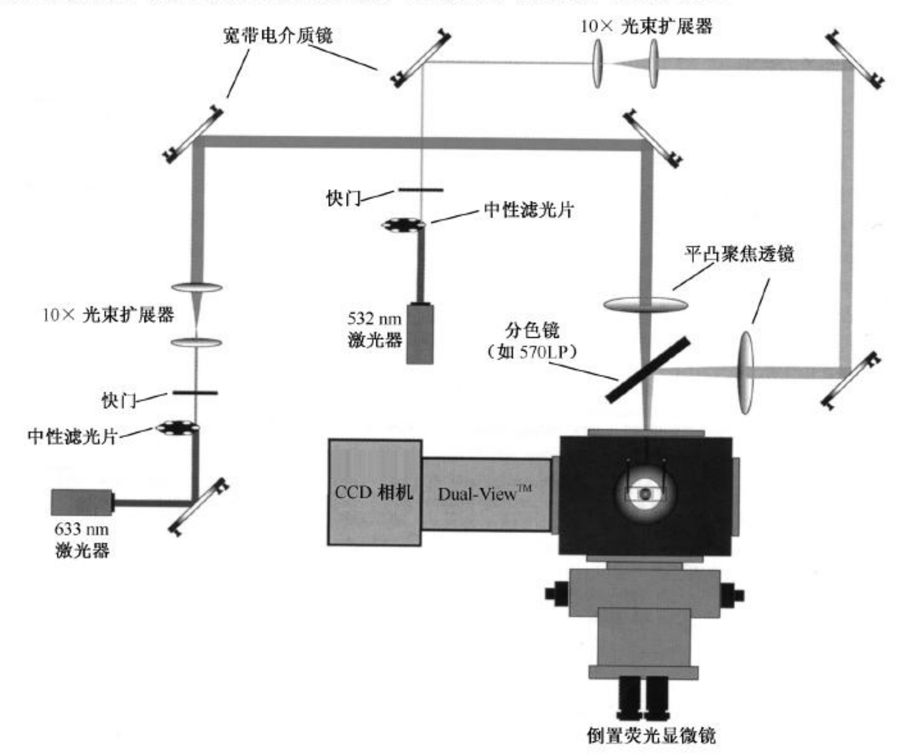



图 3-11　一个典型二色 FIONA 装置的示意图。

诊断任何可能由于漂移或者操作错误引起的偏差。进而，在布置光路时候要保持一个最小距离，当光束传播时允许它有微小地发散。这种发散将使光束能够扩张到足以获得一个高聚焦点，充满显微镜的反向光圈。

### 控制激光束进入显微镜接口

在放置好显微镜和布置好光路后，开始进行控制激光进入一个可用的显微镜接口。为了获得预想的光束特征，在激光源的下游依次安装激发滤光片、偏振器、中灰 ND 滤色镜、空间滤光镜、快门和所有其他的光学元件。每个单元之间要留有足够的空间，从而能够用标准的光学输出功率测量计测量输出功率。激发光和中灰滤光镜的角度稍微偏离朝向光传播方向 90°，为了避免反射到激光中。中灰滤光镜用于调整激光的输出功率，为了安全起见，在校准过程中应保持在最小范围。重要的是，在整个校准操作中，要注意适当地保护眼睛。

### 校准光束的高度

在多数情况下，要把激光束的高度调整到与显微镜接口一致的高度。关于接口高度的信息可以咨询显微镜制造商或者简单测量一下。两个可变光圈放在激光的下游，把它们沿着同一个光路的孔道放在光学工作台上面，并按照台子能容纳的距离把它们分隔开。调整每个光圈的高度使它们的中心对应于接口的高度。调整光束使得它能通过两个光圈的中心位置。这将确保光束位于正确的高度，它的传播方向是与工作台水平的方向，光束被校准至沿着光学工作台洞口。如不使用两个可变光圈，也可以用一个安装在轨道上的光圈，并使它能沿着光路滑行。单个光圈沿着轨道滑行排除了两个光圈可能产生的高度和角度偏差。所用激光器的类型通常决定了用何种方法把光束提高到正确的高度。例如，二极管泵固体激光器的激光头是小而紧凑的，并与电源分开的；因此，激光头能够用搁板或者台子直接抬高。然而，许多激光器体积很大，因而经常要直接放在光学工作台上，造成光束更加贴近台子表面进行传播。在这种情况下，排列一对类似于潜望镜的透镜将光束抬到适当的高度。如果激光器已经连接到纤维光缆，用立杆在适当高度将纤维端面固定至一个准直器。

随后是一些校准光束穿过两个光圈的附加细节。当用双筒镜时，为了控制透镜的角度，每个透镜要固定在一个带有两个或三个调节旋钮的活动台上，这能用于引导光束。首先调节靠近激光器的透镜（上游透镜）到光束中心，使光束通过靠近激光器的光圈（上游光圈）。接下来调节离激光器远端透镜（下游透镜），使得光束通过离激光器远端光圈（下游光圈）。校准光束通过两个光圈的中心是一个反复过程，通过逐个调节两个透镜实现光束通过两个光圈的中心。校准通过光圈时，在初始调整过程中会出现过度补偿。例如，一旦光点聚集在上游光圈，要注意它在下游光圈的位置。如果它的位置稍微靠左，则移动光点到一个越过中心稍微靠右的位置。记住上游透镜单独用于校准通过上游光圈的光束，同样下游透镜单独用于校准通过下游光圈的光束；对于每个光圈-透镜对而言，在光圈和透镜之间将达到最大距离。如果激光器高度被直接设置，而不是去调节双筒镜的两个透镜，那么只需调准激光器头部（以及放置它的搁板）来控制光束穿过光圈。

## 引导透镜控制光束进入接口

一旦光束被设定在正确的高度、水平位置和校准位置，就要开始引导透镜控制光束进入显微镜。沿着光路至少需要两个透镜来适当地帮助校准光束进入物镜。将激光器下游的第一个透镜放置到台子上，将光束粗略地聚焦在透镜上。用眼睛确认光束是水平的，并在一个通路朝向上放置第二个透镜。需要另加透镜时，在第二个透镜校准光束进入一个特殊通路之后，再将一对透镜的位置固定在活动台上。开始时要将所有活动旋钮置于中间位置，以便随后需要时可以进一步调节。操作员可以转换透镜，改变它的角度或者用旋钮调节它的方向。最简便的是保持光束顺着光学工作台的孔进入，并使透镜在90°角反射光束。放好最后一个透镜，并调整它使光束击中显微镜接口近中心的位置。把最后一个透镜固定在一个二轴转换台上，有助于校准透镜于光学工作台的洞口和双色中心。在这个透镜的下游，顺着同一条通路放置两个光圈，再一次将它们彼此分隔开。转换、旋转和倾斜透镜，直到光束穿过两个光圈的中心。再一次用下游透镜对下游光圈校准，上游透镜对上游光圈校准。校准光束穿过两个光圈将确保沿着整套通路排列并与工作台保持水平。再有，光束通过两个光圈需要四自由度。在完成这些步骤后，光束应该稳固地沿着光学工作台的洞口排列，与工作台表面保持水平，然后直接进入显微镜的反向光圈。

## 校准光束穿过物镜

校准光束穿过物镜类似于校准光束穿过两个光圈（如前一段落所述）。然而，当校准光束穿过物镜时，物镜的前后焦平面取代了两个光圈。既然有两个焦平面，那么需要四自由度来协助这种校准，这就是为什么要在光路上放置两个反射镜来控制光束进入显微镜的原因。下面的步骤叙述的是校准激光束通过显微镜物镜的程序。

1. 安装组件到显微镜中。
   i. 放置一个小的塑料十字光标在物镜转盘的一个插口中，用于替代物镜的后焦平面。
   ii. 将合适的二色镜插入荧光镜片转盘中，用于反射光束穿过物镜到达最高位置。
   iii. 将发射滤光片插入荧光镜片转盘中用于去除入射激发光，从而能在目镜中观察荧光。
   iv. 在物镜转盘剩余插口中安装一个所需的高数值孔径的物镜。
   v. 准备一张载玻片，含有稀释浓度的罗丹明（或者适用于激光的任何染料），被包夹在盖玻片和玻璃的载玻片之间。来自于载玻片染料的荧光发射将视为物镜的前焦平面。
2. 将二色镜正确地安装在荧光滤片转盘中，旋转物镜转盘直到十字光标在光路中，随着光束投射到顶点。光束很可能不穿过十字光标的中心。
3. 通过开启可动反射镜的调节旋钮来调整上游反射镜的角度，让光束位于十字光标的中心。注意在校准时尽量使每对组件（包括一个焦平面和一个反射镜）之间保持最大距离。
4. 通过寻找顶点的光斑确定光束是否连续地沿着近似垂直通路向上。如果没有，则调整下游反射镜直到它符合为止。

5. 依次调整每个反射镜，直到光束从十字光标中心沿着垂直通路行进到顶点。这一步将确保光束平行于光轴穿过物镜。
6. 旋转物镜转盘，将物镜置于光路中。
7. 加一滴浸镜油在玻片上，把荧光载玻片放在台面上，盖玻片要朝下。
8. 在目镜下聚焦荧光成像。在视野的某个位置会出现一个明亮的荧光光斑。许多倒置显微镜有一个十字光标，要么在目镜中始终能看到，要么被推到一个位置。如果显微镜没有十字光标，可以用眼睛估计中心位置。
9. 调整下游反射镜（靠近显微镜的这个反射镜）的角度直到荧光斑点位于目镜的中央。
10. 再次旋转物镜转盘把塑料十字光标放在光路中。要注意光束可能漂移并远离中心。
11. 通过两点来校准光束是个反复的过程。因此，要轮流在十字光标（后焦平面）和目镜视野内的荧光斑点（前焦平面）之间给光束确定中心。开始会有过度补偿（见“校准光束穿过物镜”）。调节上游反射镜只针对光束在十字光标的中心定位，调整下游反射镜只针对目镜中荧光斑点的中心定位。
12. 连续调整这些反射镜直到光束能同时穿过十字光标和目镜的中心。
13. 有一个附加的评判依据，假设已经正确校准的激光通过物镜，在聚焦和散焦成像之间交替观察目镜中的荧光斑点，这时如果光束校准正确的话，散焦图像应该在 $x$ 轴和 $y$ 轴匀称地显示。但是，如果散焦图像出现一种“彗星”状，则需要进一步校准。
14. 一旦获得满意的校准结果，要锁定反射镜的位置。

## 获得全内反射

这一部分讲述如何安装剩余的光学设备来获得全内反射的最佳光斑。

### 引入扩展器

由于大多数激光器射出的光束都有一个很小的直径，它不能完全充满物镜的整个反向光圈（典型的直径为 10～20 mm）。为了最大化全内反射光照区域，激光束必须被扩展。激光扩展要求两个镜片被隔离在一个特殊距离；一个镜片引起光束辐散，另一个镜片再把光束聚焦。有效扩展是两个镜片具有不同焦距的作用结果。大量的商业扩束器是可用的，扩束器也可以自己构建，把相应的镜片放到透镜筒中。需要扩展的倍数（即 2×、5×或者 10×）取决于射出光束的尺寸，这与显微镜反向光圈的尺寸有关。多数情况下，5×或者 10×的扩展是足够的。

1. 如图 3-11 所示，顺着光路引入扩束器。这种扩束器可以放置在任意位置（除了在双合透镜之间）；但是，将它放在光路前段的话，会迫使你使用更大直径的透镜。扩束器应该安装在可动装置上，便于调整角度，随后放在一个线性的平移台上。
2. 调整平移和倾斜角度以至于穿过扩束器的光束传播不被削减。放一张纸片在扩束器前面，检查是否光束被削减，如果被削减将会出现一个月牙形斑点而不是圆形斑点。理想的光斑应该是圆形的并且强度很均一。
3. 调节两个镜片之间的距离（即通过旋转镜筒调节透镜镜筒）直到光束被再次校正。

4. 用一个虹彩光圈再次测试校正情况。
   i. 在扩束器的下游放一个光圈，打开光圈直到光束只是在外周有点轻微削弱为止。
   ii. 移动同样的光圈到一个更靠近台子下游的新底座。旋转镜筒校准器直到光束的削弱程度与之前的位置相同。在两个位置之间的间隔越大，越容易观察到光束是聚集的还是偏离的。
5. 一旦光束被校正，检查通过物镜的对准度，如上一节所述。调节扩束器的角度和平移，使得重排的扩展光束得以通过物镜。注意：不要为了重新校对扩展光束而去调节透镜，否则整个调节过程又要重新操作。

## 引入平-凸调焦透镜

最后一个放入光路中的光学装置是平-凸透镜，它用于将光束聚焦到物镜的后焦平面。透镜固定于三轴平移台上，可以有效地在 $z$ 轴（指的是与光束传播相一致的轴）上平移位置。透镜放在台子上的位置取决于它的焦距，因为这个距离应该与物镜的后焦平面相一致。确保 $z$ 轴方向有足够的空间，考虑到不同放大倍数的物镜，到达后焦平面距离会有差异。透镜要安全地固定在台子上并与台面相垂直。固定物镜不动，调节透镜的倾斜和平移直到光束向上投射到顶点，它的图像是圆形的。调节透镜的 $z$ 位来获得一个最低限度发散的光斑，确保光束正好聚焦到物镜的后焦平面。此外，通过观察光束在物镜转盘的十字光标中的靶点，可以检测光束是否正好聚焦到后焦平面。

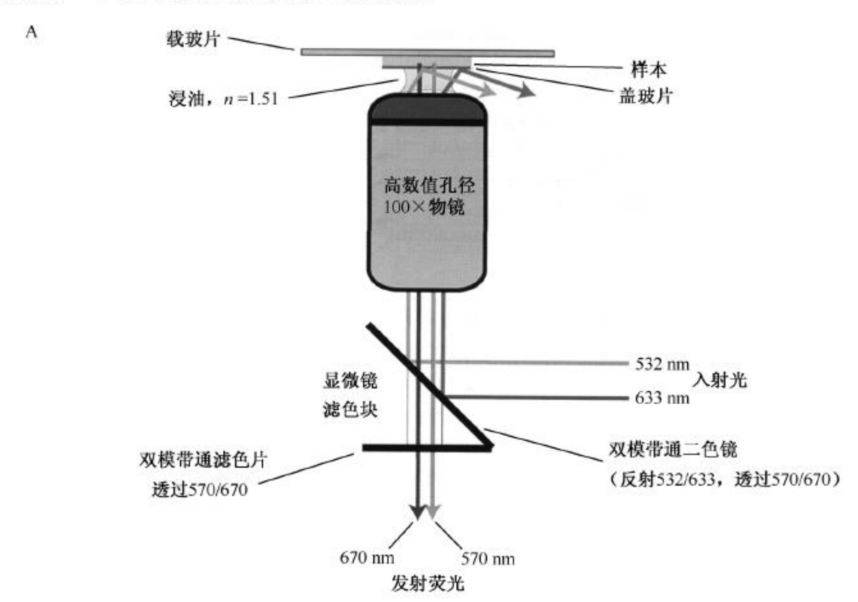
## 平移透镜以获取全内反射

外部的平-凸透镜将光束聚焦在物镜的后焦平面，光束在穿过样本之前在物镜内再次被校正。透镜在垂直于传播方向的两个轴向其中任意一个方向（或者两者组合）平移，会导致激光束从某个角度穿过物镜。在充分平移外部透镜之后，激光束将在一个足够陡的角度穿过物镜，在玻璃-水相交界面形成全内反射。为了确定获得全内反射所需平移的量，将荧光聚苯乙烯珠固定在盖玻片上，下面是可流动珠的溶液。当透镜被平移使入射角变得越来越陡时，背景荧光急剧下降。一旦获得全内反射，只能观察到固定在表面的小珠和弥散到逝场波内的残余溶解珠。连续平移透镜会导致表面的荧光完全消失。调节入射角度使得背景荧光达到最低，固定珠的亮度达到最大（注意：当倾斜激光束时要小心练习。总是保持倾斜光束远离人的眼睛和可以进入房间的任何位置）。一旦获得全内反射，固定摄影仪到显微镜上，并将光斑中心对准 CCD 阵列。通过移动摄影仪自身来校准光斑到摄影仪，或者如果摄影仪保持不动（即没有分光器或者摄影仪交换器），那么用摄影仪重复校准光束通过物镜的前焦平面步骤（见“校准光束穿过物镜”）。

## 协同校准两个分离光束进入同一个接口

双色成像实验，如 FRET 和双色 FIONA，需要两道不同波长的激光束被共同校准进入同一个显微镜接口。完成这个校准的方法与单道激光束的校准基本相同，只有一些小的改动。如图 3-11 和图 3-12B 所示，需要一个外部的半反半透镜把两道光束组合在一起。把这个透镜插入到接口上游 45°。首先按照前面介绍的方法（见“校准光束穿过物镜”）校准发射光束进入显微镜。一旦校准好发射光束，再校准反射光束进入物镜。

将每道光束校准进入物镜需要两个透镜，在这个光路中二分镜可以作为其中一块透镜（尽管可能还需要其他的透镜）。前面已经提到通过透镜平移可以获得全内反射，但是，还需要多色荧光珠和消色差透镜（注意：荧光成像则要求在显微镜的荧光滤镜中带有适配的双带宽半反半透镜和发射光滤镜；图 3-12A）。进而，CCD 阵列中的双色同步成像需要把来自于每个荧光团的发射光分开，并把单色聚焦到 1/2 队列中。这可以通过使用合适的半反半透镜、发射光滤镜和透镜或者是一个二分成像器（Optical Insights，Tucson，Arizona）得以实现。如果设备需要校准两道激光束通过一个全内反射聚焦透镜，则需要一个消色差双合透镜来纠正色差。



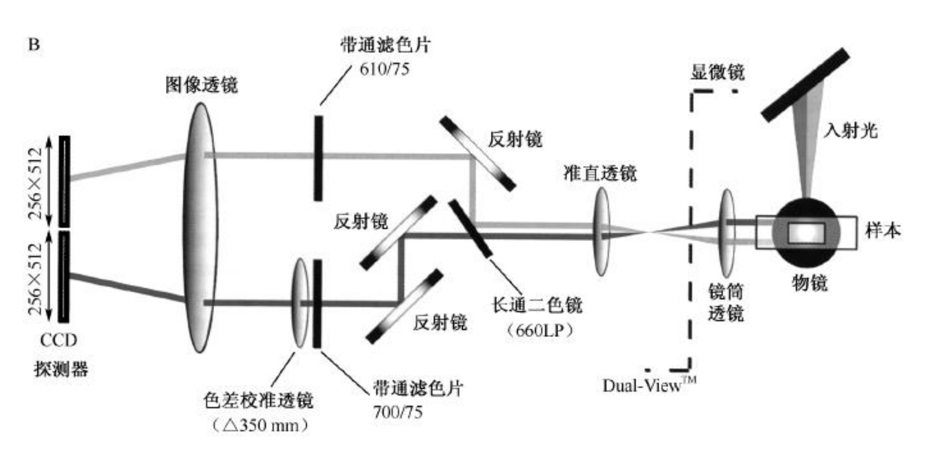




图 3-12　一个二色 FIONA 实验示意图。A. 全内反射激发样本；B. 双视野转换器将荧光发射光分入两个独立的 CCD 照相机通道，包括校正色差的透镜。

### 最后的考虑

建立一个物镜型全内反射设备要求一些试误法。在这里我们提供了一些方法，目的是让没有光学使用经验的研究者少走弯路。虽然小心操作能确保正确的校准，但这多少还是与主观因素有关。对于正确校准的最终试金石是光斑的质量和荧光成像结果。一旦获得满意的图像，不需要再进行校准。校准总是精细的，但是改善的效果会不断下降，在这之后，再进行校准也不会引起图像质量的明显改善。

## 实验方案

FIONA、SHREC或者DOPI的光学排列见图3-9。表3-1和表3-2分别提供了一个基本光学组件和双色成像所需附加组件的列表。

接下来的方案提供了各种详细的说明。例如，建立一个单分子实验的样本槽，清洗载玻片和盖玻片的两种方法，一个对照试验，运用Cy3标记的DNA来评判FIONA的效率以及可达到的分辨率水平。此外，实验方案5介绍了几种数据分析方法，实验方案6提供了一个进行明场FIONA实验的基础训练。所用水为蒸馏水或者去离子水。

# 实验方案 1：搭建一个 FIONA 的样本槽

在一个已经有可用材料的实验室，要做一个廉价的样本槽并不难。图 3-13 显示了一个典型的 FIONA 实验的样本槽。

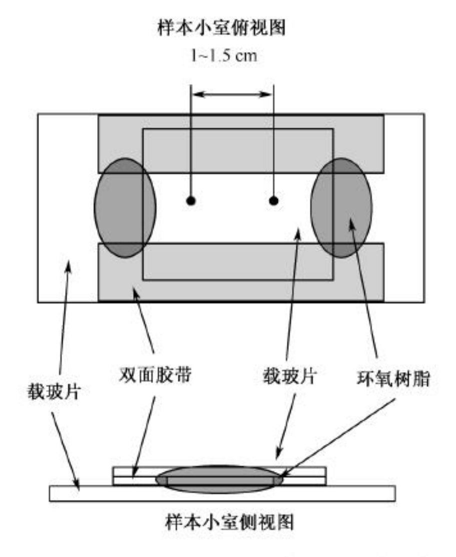



图 3-13　FIONA 样本槽的俯视和侧视图及其制作方法。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 设备

盖玻片

我们用的盖玻片是 Fisher 公司的，编号 12-544-A，223X30-1.5（No.1.5 厚 0.16～0.19 mm，它刚好适用于 1.45 NA 物镜，No.1 盖玻片也能同样适用）。对于 Olympus 1.65 NA，我们用 Olympus 或者 V-A Optical Labs 公司的高数值孔径盖玻片（APO100X-CG）。使用之前都要清洗盖玻片（见实验方案 2 或者实验方案 3）。

电钻和 3/4 mm 直径的钻头

环氧树脂（快速干燥型，如有一种是 5 min 的）<!>

载玻片

我们用的载玻片是“预清洗”的全密封微型载玻片（Gold Seal Microslides）30103X1，0.93～1.05mm。来自 Becton、Dickinson 和 Company Fisher Scientific。

擦镜纸
枪头
剃刀
双面胶
面巾纸

## 方法

1. 确定盖玻片的中心，沿着载玻片长轴方向在离中心大约 0.75 cm 的距离两端各做一个记号。
2. 在这两个点用 3/4 mm 直径的钻头钻出一个洞。
3. 用水清洗钻好的玻璃片。
4. 用实验方案 2 或实验方案 3 的方法清洗盖玻片和载玻片。
5. 放一张面巾纸在桌子上，再放一张擦镜纸在上面，把钻孔的载玻片放上面。
6. 把双面胶粘在载玻片长边上面，在两个孔之间。
7. 在载玻片上放一片清洁的盖玻片，用枪头轻压盖玻片，去除在盖玻片和双面胶之间的空气。
8. 在盖玻片的边缘用环氧树脂封闭，放置 15 min，使树脂完全硬化。
9. 从纸上取下载玻片，用剃刀裁去多余的双面胶，使得胶带只在盖玻片下。小室内的容积是 10～20 μl。

## 实验方案2：用超声清洗载玻片和盖玻片

本方案介绍用超声波仪来手工清洗载玻片和盖玻片的方法。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

试剂

丙酮＜!＞
氢氧化钾（1 mol/L）＜!＞

设备

烧杯（玻璃，大到足够放下盖玻片支架）
盖玻片

Fisher公司的，编号12-544-A，223X30-1.5（No.1.5厚0.16～0.19 mm，它刚好适用于1.45 NA物镜，No.1盖玻片也能同样适用）。对于Olympus 1.65 NA，我们用Olympus或者V-A Optical Labs公司的高数值孔径盖玻片（APO100X-CG）。

盖玻片支架（Teflon）
玻璃载玻片

我们用的载玻片是“预清洗”的全密封微型载玻片30103X1，0.93～1.05 mm。来自于Becton、Dickinson和Company Fisher Scientific。

氮气＜!＞
硝酸纤维素（可选，见步骤13）
载玻片（盖玻片）支架
超声波仪
喷水瓶
镊子

### 方法

1. 取出载玻片支架、盖玻片支架和玻璃烧杯，用水充分冲洗三次。
2. 在载玻片支架上放满载玻片，在盖玻片支架上放满盖玻片，并把放有盖玻片的支架放到烧杯中。
3. 用水充分冲洗载玻片和盖玻片。
4. 用丙酮浸泡放有载玻片的支架和有盖玻片的烧杯。
5. 将这些材料超声30 min。
6. 从烧杯支架里取走盖玻片，弃去丙酮。清除载玻片支架中的丙酮。

7. 再用水充分清洗载玻片和盖玻片。
8. 用 1 mol/L 氢氧化钾浸泡烧杯和载玻片支架。把盖玻片支架放入烧杯。
9. 将这些材料超声 30 min。
10. 从烧杯支架里取走盖玻片，弃氢氧化钾。清除载玻片支架中的氢氧化钾。
11. 再用水充分清洗载玻片和盖玻片。
12. 用镊子取出载玻片和盖玻片。用喷水瓶清洗这些玻片，用氮气轻轻吹干玻片，确定镊子是在水流到玻片之前的最后一样物品。
13. 如果需要，盖玻片在这个时候即可使用。例如，用于肌球蛋白检测的盖玻片通常包埋硝化纤维。它能增加活动性，尽管也会增加背景。根据实验需要，还能运用其他的包埋，如多聚乙二醇或者多聚 L-赖氨酸。盖玻片上包埋硝化纤维的方法如下。
    i. 移液管取 5 ml 硝化纤维线形贯穿盖玻片底部。
    ii. 将盖玻片像画刷一样拖到另一个盖玻片上，从而在第二片盖玻片上涂上一层连续的硝化纤维薄膜。
    iii. 风干包埋的盖玻片，15 min。
14. 按照实验方案 1 制备样本槽。

# 实验方案 3：用等离子腔清洗载玻片和盖玻片

等离子清洗机是一种快速有效的清洗载玻片和盖玻片的方法，用于 FIONA。实验方案 2 是用超声波的另一种清洗方案。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

试剂

异丙醇＜!＞

设备

氩气＜!＞

盖玻片

Fisher 公司的，编号 12-544-A，223X30-1.5（No.1.5 厚 0.16～0.19 mm，它刚好适用于 1.45 NA 物镜，No.1 盖玻片也能同样适用）。对于 Olympus 1.65 NA，我们用 Olympus 或者 V-A Optical Labs 公司的高数值孔径盖玻片（APO100X-CG）。

载玻片

我们用的载玻片是“预清洗”的全密封微型载玻片 30103X1，0.93～1.05 mm。来自 Becton，Dickinson 和 Company Fisher Scientific。

氮气＜!＞

硝酸纤维素（可选，见步骤 4）

电浆清洗机

镊子

## 方法

1. 用异丙醇清洗盖玻片和载玻片。
2. 用镊子取出载玻片和盖玻片。用喷水瓶清洗这些玻片，用氮气轻轻吹干玻片，确定镊子是在水流到玻片之前的最后一样物品。
3. 把载玻片和盖玻片放到等离子清洗仪中处理 5 min。

   我们用氩气来产生等离子，因为空气处理盖玻片会引起明显的荧光熄灭。
4. 如果实验需要，盖玻片在这个时候即可使用。例如，用于肌球蛋白检测的盖玻片通常包埋硝化纤维。它能增加活动性，虽然也会增加背景。根据实验需要，还能用于其他的包埋，如多聚乙二醇或者多聚 L-赖氨酸。盖玻片上包埋硝化纤维的方法如下。

   i. 移液管取 5 μl 硝化纤维线形贯穿盖玻片底部。

   ii. 将盖玻片像刷子一样拖到另一个盖玻片上，从而在第二片盖玻片上涂上一层连续

的硝化纤维薄膜。

iii. 风干包埋的盖玻片，15 min。

5. 按照实验方案 1 制备灌流槽。务必使等离子清洗的表面面对槽的内侧（即它要面对载玻片）。

# 实验方案4：脱氧环境固定Cy3-DNA的成像

在载玻片的脱氧环境中固定Cy3-DNA可以有效地评估FIONA装置的效率和获得1.5 nm分辨率的能力（Yildiz et al. 2003）。实验中很重要的一点就是荧光团要保持光稳定性。在介质中需要一种清除氧气的物质（如葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶）。通常情况下，维生素E类似物或β-巯基乙醇（β-ME）也被使用来增加稳定性并减少荧光团的闪烁（Wang et al. 2004；Rasnik et al. 2006）。当荧光团吸附在特定的蛋白质或者DNA分子上时，它必须经过检测保证它的荧光稳定性没有受到影响。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

牛血清白蛋白（BSA）-生物素（1 mg/ml；Sigma-Aldrich A-8549）溶于T50缓冲液中

Cy3-DNA溶于（10 pmol/L）T50缓冲液中，包含终浓度为0.5～1 mg/ml的BSA（Sigma-Aldrich A-908）或者终浓度约为0.5 mg/ml的酪蛋白

Gloxy（葡萄糖氧化酶＜!＞/过氧化氢酶）

使用Sigma-Aldrich公司的葡萄糖氧化酶（G-7016）和Roche公司的过氧化氢酶（10106810001）。将35 mg葡萄糖氧化酶（6860 U）溶解于200 μl的T50（或类似的）缓冲液中。加入80 μl（约104 000 U）的过氧化氢酶，然后将溶液13 000 *g*离心5 min。将上清液用0.22 μm针筒过滤器过滤（Millipore SLGP033RS）或用离心过滤器过滤（Amicon UFC30GVNB）。

成像缓冲液——用维生素E类似物或β-巯基乙醇制成（见下文）

用维生素E类似物制备100 μl成像缓冲液：首先制备维生素E类似物溶液（饱和的；6-羟基-2，5，7，8-四甲基色烷-2-羧酸；Sigma-Aldrich 238813）＜!＞（见下文）。混合4 μl 10%的葡萄糖（10 g/100 ml），1 μl 1 mol/L $MgCl_2$＜!＞，94 μl维生素E类似物（见上文），并加入1 μl Gloxy。注意：在使用成像缓冲液前临时加入Gloxy（见步骤6）

对于运动性试验，推荐使用40%的维生素E类似物，即将配方中的维生素E类似物减少至40 μl，并加入54 μl的T50缓冲液或类似的缓冲液。对于肌球蛋白实验，使用M5缓冲液[20 mmol/L HEPES（pH 7.6）包含2 mmol/L $MgCl_2$＜!＞、25 mmol/L KCl＜!＞和1 mmol/L EGTA]。

用β-巯基乙醇制备100 μl成像缓冲液：混合4 μl 10%的葡萄糖（10 g/100 ml），1 μl 1mol/L $MgCl_2$，93 μl T50缓冲液，并加入1 μl Gloxy。注意：在使用成像缓冲液前临时加入Gloxy（见步骤6）

抗生物素蛋白链菌素（0.2 mg/ml抗生物素蛋白链菌素；Molecular Probes S-888）溶在T50缓冲液中

T50 缓冲液（10 mmol/L Tris，pH 8.0，含有 50 mmol/L NaCl）

维生素 E 类似物溶液（饱和的；6-羟基-2，5，7，8-四甲基色烷-2-羧酸；Sigma-Aldrich 238813）<!>

转移 5 mg 维生素 E 类似物到一个 15 ml 的试管。向试管中加入 10 ml 需要的缓冲液（如 M5 用于肌球蛋白运动性实验），并充分混合均匀使得维生素 E 类似物在缓冲液中饱和（可以适度地用水稀释）。然后用 0.22 μm 的针筒过滤器（如 Millex GP；Millipore SLGP033R）过滤混合物。用 NaOH 将缓冲液的 pH 调至 7.5<!>，因为维生素 E 的酸度会影响荧光子的耐光性。

## 装置

样本槽（按实验方案 1 中组装）

移液器枪头（200 μl）

## 方法

1. 将一个 200 μl 的枪头插入灌流样本槽的一个孔中。用枪头向样本槽中加入 50 μl 溶解于 T50 缓冲液的 1 mg/ml 的 BSA-生物素。将样本槽在室温下温育 10 min。
2. 用 100 μl T50 缓冲液清洗样本槽。
3. 向样本槽中加入溶解于 T50 缓冲液的 0.2 mg/ml 的抗生物素蛋白链菌素。室温下温育 5 min。
4. 用 100 μl T50 缓冲液清洗样本槽。
5. 向灌流样本槽中加入 50 μl 溶于 T50 的 10 mmol/L 的 Cy3-DNA 溶液（包含终浓度为 0.5～1 mg/ml 的 BSA 或终浓度为 0.5 mg/ml 的酪蛋白），温育 5 min；然后用100 μl T50 缓冲液冲洗。
6. 向样本槽中加入 100 μl 成像缓冲液。

   一般情况下，在加入 Gloxy 以后，经过一段时间后 pH 会下降，因为清除氧气产生的一种副产物是葡萄糖酸。为了将样品保持在更加稳定的 pH，制备成像缓冲液时先不加入 Gloxy，而在把缓冲液加入到样本槽之前再将 Gloxy 加入其中，然后每隔 15～20 min，往样本槽中加入一定量新制的成像缓冲液（用同样的方法制备）。在成像缓冲液加入样本槽之前，加入 Gloxy。

## 实验方案5：数据分析方法

目前FIONA实验的数据分析需要一些软件程序。CCD照相机（Andor Technology）能照出SIF格式的影片（标准图片格式），这些图片通过Andor Technology软件处理后，能变成TIFF（紧凑图片文件格式）格式的文件。我们用WinView32（Roper Scientific）把输出的TIFF数据文件转换为影片。这个起始化的筛选是用来选出研究中特殊的有合适运动性的分子。输出和检查程序的使用取决于它们与照相机软件和其他捕获设备的兼容性。WinView32也能够切除和保存一个影片文件所需要的部分，将视频文件转换成ASCII格式，并且通过赋给图片文件读取亮度一个阈值而消除背景噪声。然而，WinView32（不是免费的）仅仅可以通过Roper Scientific获取。WinView32的一个免费替代品是ImageJ，这个多样化的程序可以使使用者操作一系列的TIFF影片并且实现许多其他功能。这些功能包括简单的操作，如改变帧之间的过渡时间以使影片可以放得比它们的真实时间更慢或者更快。更复杂的操作包括对每个影片的帧进行快速傅里叶变换和其他的统计操作。ImageJ也能够把TIFF影片转化为像AVI或者MOV的格式（Quick Time格式）。ImageJ能从http://rsb.info.nih.gov/ij/下载获得。

在选择蛋白质用于进一步研究之后，可以这样分析蛋白质的运动性，即通过一个二维高斯方程拟合出每幅帧中荧光团的点扩布作用。为了完成这个任务我们可以使用写在IDL程序语言中的定制软件，同时最近可以获得一个美国国立卫生研究院（NIH）支持的免费项目——Video Spot Tracker，这对于大部分普通的分析方法已经足够了。Video Spot Tracker是利用NIH提供给国家生物医学图像和生物工程局的赞助，以及在北卡罗来纳大学建立的显微镜及操作的计算机综合系统中的国家研究资源而发展起来的。这个程序可以从：http://www.cs.unc.edu/Research/nano/cismm/download/spottracker/video_spot_tracker.html下载

Video Spot Tracker程序的使用说明也可以从以上网址得到。它能够从视频文件中追踪一个或者多个颗粒，与Microsoft DirectShow相匹配。这些视频文件可以来自一个与Microsoft DirectShow兼容的成像仪、一个Roper Scientific成像仪、一个DiagInc Spot成像仪、一个连接到EDT视频捕捉板的成像仪，或者来自一系列的TIFF或者BMP文件。这个程序当前仅仅可以在Windows平台上运行。FIONA是Video Spot Tracker的各种追踪选项之一。使用这个程序时需牢记以下几点：

- 减低跟踪指示器，使得它对于正常的荧光团尽可能的小（半径等于1）；
- 为了实现纳米分辨率，应把精确度降到最低（0.001像素）；
- 如果需要更敏感的跟踪效果，选择插补选项。

原则上，这个程序可以跟踪TIFF影片的颗粒，但我们在操作时仍会遇到一些问题。然而，我们可以用ImageJ把影片转化成AVI格式，并用Video Spot Tracker来跟踪颗粒。

作为输出方式，Video Spot Tracker提供了分子的 $x$-$y$ 坐标位置，每一帧用像素表示。通过把帧数转化成真实时间，每一个像素数值转化为真实位置，分子的运动轨道就可以确定了（如果对分子马达的运动步宽有兴趣，就像它对于我们的实验那样，这个轨道下一步就会输入一个程序，这个程序用 $t$ 检验或者其他一些分析方法来确定数据中的

步移）。

很多商业途径可以得到的程序，能够执行上述所有工作。然而这些程序的价格现在都在 10 000 美元左右。这些程序包括 Andor iQ（Andor Technology）、MetaMorph（Universal Imaging Corporation）、Image Pro（Media Cybernetics）和 3I's Workbench（Intelligent Imaging Innovations）。其余的程序可以从 selvin@uiuc.edu 得到。

## 实验方案 6：使用明场 FIONA

单纳米精度的明场成像（bFIONA）是在不使用荧光分子的情况下利用明场显微镜来获取 FIONA 的瞬时光谱分布。bFIONA 追踪的是不透明的生物学特性，如黑色素体（就是装满黑色素的小囊泡）。bFIONA 追踪是通过将一个二维的高斯方程拟合成一个负的（相反的）图像，这个图像是用电荷耦合装置（CCD）照相机收集明场光照而形成。以下的实验方案提供了使用 bFIONA 的基本步骤。显微镜不需要装备特别的镜片，只需要一个标准的透射灯、一个高数值光圈和一个倍增电荷耦合成像仪即可，见表 3-1 叙述。详细的实验材料和步骤都在 Kural 等（2007）中有描述。

黑色素体，含有黑色素体的细胞，都被放置在一个被多聚赖氨酸处理过的玻璃底的盘子上。碘钨灯（50～150 W）从上方将这些细胞照亮。在没有黑色素的地方，光将最大限度地传播过去并通过倒置显微镜 100 倍的油镜而被收集。传播过来的光被一个有 1～2 ms 瞬时分辨率的背照芯片倍增电荷耦合装置（CCD）成像仪记录成图像。

包含单个黑色素体的透射图像的影片的每一张图像都要通过减去临界值的透射图像来反转。负向的透射图像拟合成二维高斯方程，如下：

$$P_G(x, y; z_0, A, x_0, y_0, s_x, s_y) = z_0 + A\exp\left\{-\frac{1}{2}\left[\left(\frac{x-x_0}{s_x}\right)^2 + \left(\frac{y-y_0}{s_y}\right)^2\right]\right\} \tag{2}$$

式中，$z_0$ 为一个常数，与背景有关；$A$ 为振幅；$x_0$ 和 $y_0$ 分别为相对于中心的坐标；$s_x$ 和 $s_y$ 在各个分散的方向上作为标准偏差。

## 致谢

作者感谢美国国立卫生研究院（NIH）给予的支持。

### 参考文献

Balci H., Ha T., Sweeney H.L., and Selvin P.R. 2005. Interhead distance measurements in myosin VI via SHRImP support a simplified hand-over-hand model. *Biophys J.* **89:** 413–417.

Bartko A.P. and Dickson R.M. 1999. Imaging three-dimensional single molecule orientations. *J. Phys. Chem. B.* **103:** 11237–11241.

Bohmer M. and Enderlein J. 2003. Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* **20:** 554–559.

Burgess S., Walker M., Wang F., Sellers J. R., White H. D., Knight P. J., and Trinick J. 2002. The prepower stroke conformation of myosin V. *J. Cell Biol.* **159:** 983–991.

Churchman L.S., Okten Z., Rock R.S., Dawson J.F., and Spudich J.A. 2005. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 1419–1423.

Enderlein J., Toprak E., and Selvin P.R. 2006. Polarization effect on position accuracy of fluorophore localization. *Opt. Express* **14:** 8111–8120.

Gordon M.P., Ha T., and Selvin P.R. 2004. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 6462–6465.

Ha T., Enderle T., Chemla D.S., Selvin P.R., and Weiss S. 1996. Single molecule dynamics studied by polarization modulation. *Phys. Rev. Lett.* **77:** 3979–3982.

Kinosita K., Jr., Itoh H., Ishiwata S., Hirano K., Nishizaka T., and Hayakawa T. 1991. Dual-view microscopy with a single camera: Real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J. Cell Biol.* **115:** 67–73.

Kural C., Kim H., Syed S., Goshima G., Gelfand V.I., and Selvin P.R. 2005. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: A tug-of-war or coordinated movement? *Science* **308:** 1469–1472.

Kural C., Serpinskaya A., Chou Y.-H., Goldman R.D., Gelfand V.I., and Selvin P.R. 2007. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 5378–5382.

Lacoste T.D., Michalet X., Pinaud F., Chemla D.S., Alivisatos A.P., and Weiss S. 2000. Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9461–9466.

Mehta A.D., Rock R.S., Rief M., Spudich J.A., Mooseker M.S., and Cheney R.E. 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400:** 590–593.

Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J.,

Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., and Weiss S. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307:** 538–544.

Milescu L.S., Yildiz A., Selvin P.R., and Sachs F. 2006a. Extracting dwell time sequences from processive molecular motor data. *Biophys J.* **91:** 3135–3150.

———. 2006b. Maximum likelihood estimation of molecular motor kinetics from staircase dwell-time sequences. *Biophys J.* **91:** 1156–1168.

Patra D., Gregor I., and Enderlein J. 2004. Image analysis of defocused single-molecule images for three-dimensional molecule orientation studies. *Phys. Chem. A* **108:** 6836–6841.

Qu X., Wu D., Mets L., and Scherer N.F. 2004. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 11298–11303.

Rasnik I., McKinney S.A., and Ha T. 2006. Nonblinking and longlasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3:** 891–893.

Snyder G.E., Sakamoto T., Hammer J.A., III, Sellers J.R., and Selvin P.R. 2004. Nanometer localization of single green fluorescent proteins: Evidence that myosin V walks hand-over-hand via telemark configuration. *Biophys. J.* **87:** 1776–1783.

Syed S., Snyder G.E., Franzini-Armstrong C., Selvin P.R., and Goldman Y.E. 2006. Adaptability of myosin V studied by simultaneous detection of position and orientation. *EMBO J.* **25:** 1795–1803.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J.* **82:** 2775–2783.

Toprak E., Enderlein J., Syed S., McKinney S.A., Petschek R.G., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2006. Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 6495–6499.

Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S., and Pang C.P. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin. Chem.* **50:** 952–954.

Yildiz A., Tomishige M., Vale R.D., and Selvin P.R. 2004a. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303:** 676–678.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

Yildiz A., Park H., Safer D., Yang Z., Chen L.Q., Selvin P.R., and Sweeney H.L. 2004b. Myosin IV steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin. *J. Biol. Chem.* **279:** 37223–37226.

（杨 巍 译）

# 第4章 荧光探针共定位：具有纳米级分辨率的精准定位

**L. Stirling Churchman**[*][†] **James A. Spudich**[*]

[*] Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305;

[†] Department of Physics, Stanford University, Stanford, California 94305

## 摘要

荧光探针共定位被广泛应用于细胞生物学领域，用以分辨两个蛋白质在细胞内的距离。由于光学显微镜的分辨率被限制在250 nm，因此并不需要高分辨率的共定位技术。然而，随着细胞生物学和单分子生物物理学等领域高分辨率技术的发展，共定位技术也需要随之发展。在衍射极限之内，可以使用几何变换（平移、缩放、旋转）的方法对两个光通道取得的图像进行整合；但要在高分辨率条件下获得共定位图像，仅仅进行几何变换是不够的。对单个荧光探针进行成像，采用单分子高分辨率共定位（SHREC）技术，需要使用加权平均变换，可以得到至少10 nm的共定位分辨率。本章将阐述校准数据集的采集过程，以及如何对数据进行正确分析，从而决定使用何种变换的方法。

## 概述

生物系统中各个独立部分（如单个蛋白质和全细胞）之间有怎样的关联，常常需要通过显微镜进行观察，根据检测到的它们之间的物理距离进行推断。无论是在体或者离体情况下，蛋白质之间的距离，都是用于推断它们是否发生相互作用的指标。而随着新科技提升了单个蛋白质（Gustafsson 1999, 2005; Betzig et al. 2006; Donnert et al. 2006; Rust et al. 2006）检测的空间精确度，蛋白质共定位的精确度也需相应提高。在单分子检测的生物物理学领域，对酶分子动力学的研究同样得益于对单个蛋白质结构域的精确的定位。单个酶分子的结构动力学实现可视化之后，酶催化过程中酶分子构象变化可以清楚地被展示出来。细胞生物学和酶生物学都受益于荧光共振能量转移技术（FRET），该技术可以测定分子之间的距离。但是FRET技术无法测量距离的绝对值，而且也不能测量10 nm以上的距离。能够准确和精确地对光谱性质不同的荧光标记之间的距离进行测定的技术将被非常广泛地应用于研究和解决生物学问题。它正好可以弥补FRET不能检测10 nm以上距离的缺点，并且能对两个探针之间的绝对距离进行动态测量。

许多具有不同分辨率，并且易于操作的策略已经被用于对距离范围在10～100 nm的荧光探针进行共定位（van Oijen et al. 1998; Lacoste et al. 2000; Schmidt et al. 2000; Michalet et al. 2001; Koyama Honda et al. 2005）。本章介绍其中的一种技术——单分子高分辨率共定位技术（Churchman et al. 2005）。在所有共定位技术中，SHREC具有最高的共定位分辨率，并且最易于操作。本章介绍SHREC技术需要的设

备，配准数据的获取，对多通道成像进行综合分析以得到高分辨率图像的方法，以及构建多成像通道之间高分辨率图像映射的分析过程。

## 理论

在研究中，研究者通常使用发射光频率不同的荧光探针对同一样本进行标记。使用双荧光远场显微镜时，来自于同一样本平面的影像根据其波长不同而被分别记录成两幅不同的图像。不同通道下记录的图像不能直接互相叠加，因为它们的成像路径不同。不同的成像路径使用不同的透镜和反射镜，加上色效应的存在，其产生的图像会有相对移位。理论上说，只需要对某一通道的图像相对于另一通道的图像使用线性等角投影的转换方法，进行旋转、缩放以及平移就可以调整色差。然而实际上引起色差的视觉元件本身并不是非常精密，如果要获得纳米数量级的共定位分辨率，就要使用局部非线性方法对不同通道的图像进行映射。本章介绍 Goshtasby 的加权平均值变换的方法来纠正图像偏差。加权平均值变换不是唯一能获得如此高分辨率的处理方法，它的优势在利用 MATLAB（The MathWorks，Natick，Massachusetts）软件的程序和成像分析工具箱就能完成这一变换。

用包含大量相应位置点的数据集合作为对照，能够得到对映射的最准确计算。实际上，往往使用标准样来完成这一操作：标准样在样本平面上，能够在各个成像通道上都被检测到。荧光小珠是一种很好的选择，因为荧光小珠发光强而且相对光稳定性高。此外，如果荧光小珠的尺寸在衍射极限内，那么它在各个通道产生的图像就是显微镜的点扩散方程，因而荧光小珠能够通过二维高斯方程被非常精确地定位。对全视场标准样荧光小珠进行成像后，可以确定一组对照点，然后进行映射计算。在对之后的数据集进行转换时就可以使用这一映射。在某一成像通道中测定的某一位置能够被准确地定位到其他的成像通道。

需要注意的是，也许在测定对照点时就存在误差。在确认映射时要将对照点误差降低至小于共定位误差。许多荧光小珠的亮度很高因此可以在高分辨率下进行定位。在任何通道都要进行误差确认。第 3 章具体介绍了 1 nm 精确度的成像（FIONA），提供了点定位和相关误差的详细说明。

## 仪器设备

全内反射显微镜（TIRFM）能够消除大量的背景荧光，非常适用于检测单个荧光小珠（Axelrod et al. 1984）。这里介绍两种使用全内反射显微镜检测单分子的方法：①在石英片层上偶联石英棱镜，在片层的另一面放置样本，然后在成像缓冲液的约 100 μm层处放置玻片，收集透过玻片的信号；②使用数值孔径大于 1.4 的目镜，目镜会使激发光转折至全反射角。目镜同时能够收集发射光。以上两种全内反射显微镜的方法与 SHREC 技术是兼容的，尽管目前使用的透过物镜法的 TIRFM 技术还有待改进。显微镜使用的相关细节应根据具体实验目的进行调整，这里就搭建显微设备的方法进行大致的介绍。需要注意的是 SHREC 并不依赖于 TIRFM。使用比单个荧光小珠荧光强

度高的探针时，可以使用其他成像设备，并结合 SHREC 方法进行分析。

## 激发光路

激发光源使用激光射线，其所给的激光波长是荧光探针激发光波长的峰值，这样就可以将荧光探针的发射光从入射荧光中完全滤出。例如，结合使用 Nd：Yag 激光器（Compass 215 M，15 mW，532 nm；Coherent Inc.，Santa Clara，California）、氦氖激光器（25 mW，633 nm；JDS Uniphase，San Jose，California）和分光镜对荧光探针 Cy3 和 Cy5 进行激发和成像的系统（图 4-1）。能够分别控制各激发光的强度非常重要，可以在各路激光之前设置 OD 滤光盘，或者在分光镜和强度较高的激光器之间设置滤光盘。置于分光镜之后的 1/4 波片（quartz multiorder λ/4 plate；Newport Corporation，Irvine，California）能够改变激发光的偏振方向，从而使得所有方向的荧光探针能够同等得被激发。为了使激发光尽量均匀地布满整个视野，可以使用两面透镜组成望远镜，这样可以将两束激光的直径从 2 mm 增加到 10 mm。如图 4-1 中显示的设备，透镜 L1（$f$=2.5 mm）和透镜 L2（$f$=95 mm）组成望远镜。在望远系统之后的可变光阑将所需区域之外的多余光束剪切掉。第三面透镜（L3；$f$= 500 mm）设置在望远系统之后，用以将光束聚焦在目镜背孔处（Olympus 1.65 numerical aperture［NA］100× TIR-FM）。由于透过望远系统的光已经被校准过，因此第三面透镜的焦距必须和该透镜到

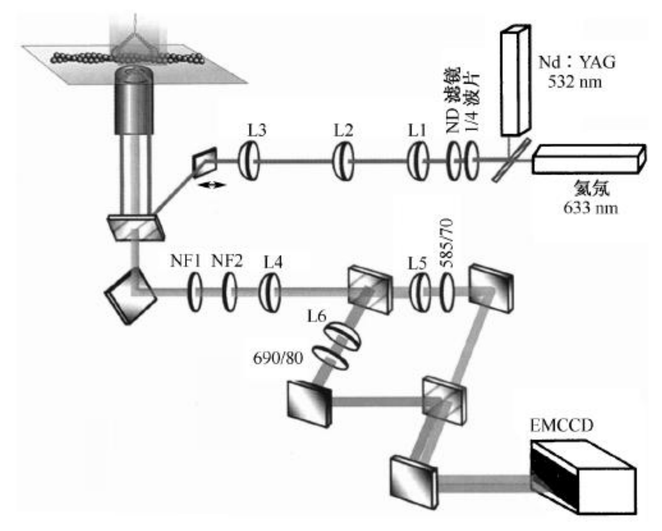



图 4-1　SHREC 技术所使用的显微镜结构。不同波长的激光离开激光器，通过分光镜后结合为单束激光，再经过 1/4 波片被环化，ND 滤镜（ND filter）减弱光强，由 L1 和 L2 透镜组成的望远系统能扩展光束的直径。L3 透镜将光束聚焦至目镜背孔，因而光束可以平行地离开目镜。所有光都在玻片/水界面发生全内反射，所产生的渐逝波将照射样本表面很薄的一层。同样透过目镜收集发射光，并传递给发射光路。陷波滤波器（NF1 和 NF2）能够阻挡进入发射光路的激光。发射光通过 L4 聚焦到成像平面，然后根据波长被分光镜分开。分开后的发射光分别穿过透镜（L5 和 L6），并通过同一分光镜合并为一束。不同的发射光形成的图像被传递给 EMCCD 相机（在对各部分组成元件的技术说明中有具体介绍）。

目镜背孔的距离相同。一面反射镜设置在微位移工作台上，将光束反射到分光镜，分光镜能够反射波长为532 nm 和633 nm 的光束，但不能反射 Cy3 和 Cy5 的发射光（532～632 nm 分光板；Chroma Technology Corp）。微位移工作台能够将入射光靶向目镜的中心或者边缘。当入射光穿过目镜中心，显微镜处于倒置模式；而当入射光穿过目镜边缘，入射光将弯曲，于是在承载样本的玻片和水的界面处发生全内反射。在 TIRFM 目镜上方设置有闭环双轴压力式纳米微位移工作台，该工作台装备了能够进行位置测定的电容传感器（Physik Instrumente，Auburn，Massachusetts）。使用 SHREC 技术时，压力式工作台能够非常便捷地对基准数据进行记录。然而压力工作台并不是必需的。本章也会介绍在不使用压力式纳米微位移工作台的情况下应用 SHREC 的方法。

## 发射光路

荧光探针的发射光通过目镜收集后穿过分光镜。之后发射光经反射镜反射，并通过两面陷波滤波器（NF1 和 NF2）[StopLine U-grade（OD 6），波长分别为532/17 nm 和633/25 nm，Semrock Corp.，Rochester，New York] 来阻挡任何漏过的发射激光。管形透镜（L4＝120 mm，见图 4-1 和图 4-2）将发射光聚焦通过两片刀片相夹的 1 mm 宽的狭缝，除去任何不能被相机接收的光。这样可以保证两个通道的发射光不会在摄像装

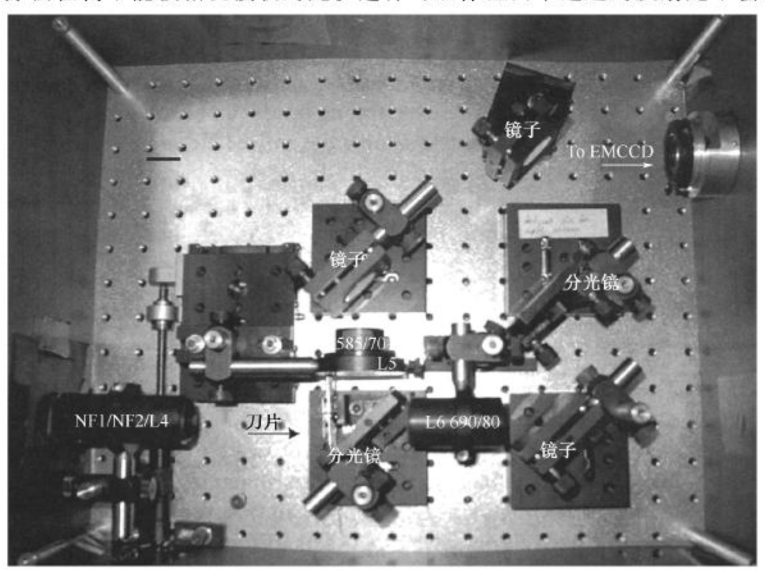



图 4-2　SHREC 技术所使用的发射光路。陷波滤波器以及透镜 4（NF1/NF2/L4）安装在单管中。两面刀片分别安装在小型微位移平台上，微位移平台之后为第一面分光镜（dichroic mirror）。透镜 6（L6）和 Cy5（L6，690/80）的发射滤光器同样安装在单管中，处于分光镜的出光面后方。透镜 5（L5）安装在另一微位移平台上，可以在发射光路箱外对 L5 进行调节。在光路发生偏移的情况下，使用 L5 可以将不同通道的光分开。在 L5 之后设置 Cy3（585/70）的发射滤光器。常规光学反射镜将两束发射光重新导向同一面分光镜，从而将两束发射光结合。最后一面反射镜将图像分别传递给 EMCCD 相机。分光镜和常规反射镜依靠磁力安装，这样当对单色大视场进行成像或者对不同染料进行成像时可以方便地对光路进行调整。

置的 CCD 芯片中发生混淆。一面分光镜（625 LP 电子束分裂器；Chroma Technology Corp）将两种荧光探针的发射光分开，并且沿不同的路径传递。两条路径都设置一面透镜（L5 和 L6，$f$=50 mm），将光束聚焦到电子倍增电荷耦合（EMCCD）成像装置(iXon DV 887 EMCCD；Andor Technology，Belfast，Ireland)，这样就可以分别调节两道发射光的聚焦。在透镜之后设置发射光滤光器，尽可能地滤过探针发射光的波峰光。对于 Cy3 和 Cy5，分别使用 585/70 滤光器和 690/40 滤光器。滤光器之后设置第二面分光镜，使得两束发射光以并列平行的方式照射在 EMCCD 成像装置上。EMCCD 摄像装置的噪声读出很低而量子效率很高，因此单分子成像能力很强。

如图 4-1 和图 4-2 设置的发射光路径的像素尺寸为 27.7 nm。在像素尺寸远大于 27.7 nm 时，受衍射极限的光斑能在较高的分辨率下成像（Thompson et al. 2002）。实际上相机是以 4×4 的面元划分模式运行的，因此有效像素尺寸为 110.7 nm，视场尺寸为14 μm×7 μm。在发射光路设置别的透镜可以减小放大倍数。这样就必需使用面元划分模式，同时能够扩大成像的视场范围。然而一旦对较大的区域进行成像，就需要更多的配准数据，进行更多的分析。我们发现，对尽可能小的区域进行配准最为方便。因为无论如何，映射是局部的，因此对更大面积进行配准也会产生相似的分辨率。

## 获得基准数据

选择基准标记有一定的要求，它能够足够精确地被定位，使得它自身的定位误差可以被忽略。作为好的基准，荧光小珠发射光强度在任何通道都要足够强，并且在对配准数据进行记录的过程中不发生光漂白。大的荧光小珠发光强度高于小的荧光小珠。但如果荧光小珠在衍射极限之外，那么它轻微的不对称就会导致在定位时产生很大的误差。在衍射极限内的荧光小珠能够更有效地被定位，因为可以根据二维高斯方程对其图像进行转换。在将 SHREC 技术应用于对 Cy3 和 Cy5 进行成像的改进过程中曾使用 100 nm TransFluoSphere 荧光小珠（543/620；Molecular Probes)。

将荧光小珠黏附在玻片上，将视场划分为网格样，通过压力式纳米微位移工作台移动荧光小珠并且进行成像，就可以获得基准数据。网格的尺寸越小，共定位的分辨率越高。同时就会得到更大的基准数据集，也就需要更多的计算循环对数据进行分析。理论上说，网格尺寸的极限取决于基准标记的定位分辨率、压力式纳米微位移工作台的分辨率，以及基准标记的光稳定性。视场 14 μm×7 μm，网格距离 0.5 μm，可以得到 3.3 nm的共定位分辨率，30 Mb 基准数据，用常规的笔记本电脑只需数分钟可以完成数据分析。

获取高分辨率映射的基准分布标准，仅仅是对视场均匀地进行取样。基准标记（荧光小珠）的分布形式实际并不重要，然而使用微位移平台构建网格模式是一种能够保证样本符合分布标准，同时操作最便捷的方法。此外，也可以使用标准显微镜台，通过移动显微镜台逐步对整个视场的局部进行成像，直至覆盖全视场。使用压力式微位移工作台则可以自动化收集基准数据，并保证全视场中没有被遗漏的像点。因此在设备中设置压力式微位移工作台是非常值得的，即便它并无其他应用之处。本章同样介绍了在不使用压力式微位移工作台时如何进行基准数据的采集。

基准数据集包含一组 $N$ 幅图像，每帧图像显示一个荧光小珠在某一光通道下处于某一特定位置时的成像（图 4-3）。要计算从一个光通道到另一光通道的映射，首先要确定荧光小珠在每个光通道下的位置。如果不使用压力式纳米微位移工作台来进行基准数据的采集，那么得到的图像较少，而且每帧图像包含多个荧光点。在这种情况下，每帧图像上每一个荧光小珠的位置都需要确认。对于衍射限制的点，应用二维高斯方程进行最小二乘法拟合最为精确：

$$f(x,y) = z_0 + A\exp\left[-\frac{1}{2}\left[\left(\frac{x-\mu_x}{\sigma_x}\right)^2 + \left(\frac{y-\mu_x}{\sigma_y}\right)^2\right]\right]$$

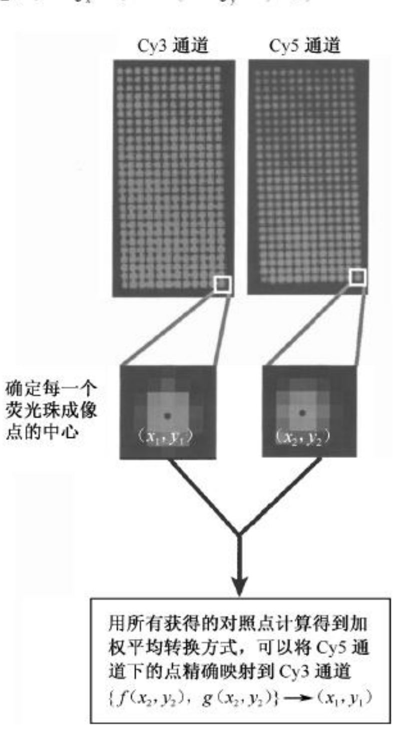



图 4-3 数据收集和分析决定从某一通道到另一通道的图像转换形式。使用发射光谱很宽的荧光小珠，荧光小珠发射的荧光能够在两个通道中都被检测到，以网格样的方式在全视场移动荧光小珠。（上图）移动荧光小珠产生的网格模式。在各通道内确定荧光小珠的位置，产生一对对照点，$\{(x_1, y_1), (x_2, y_2)\}$（中图）。用所有获得的对照点来计算从某一成像通道到另一成像通道的加权平均转换方式。

如果是受到散粒噪声的限制，则定位误差为

$$\sigma_\mu = \frac{\sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}}{\sqrt{N_\gamma - 1}}$$

式中，$N_\gamma$ 为光子数。同时这也是基准定位误差。第 3 章和其他参考资料（Cheezum et al. 2001；Thompson et al. 2002；Yildiz et al. 2003）对这一类误差进行了详述。此外，还要注意的是，基准定位误差也应该等于或者小于期望的配准误差。

每帧图像都进行拟合之后，就可以确定 $N$ 个位置，分别代表视场中所有荧光小珠在两通道下的位置。这些定位点被称为对照点。对照点集可以用于计算局部加权平均映

射，从而用于分析后续研究中得到的数据点。首先，对于每一个对照点，在通道 1 下挑选距离它最近的 6 个对照点（如有需要可选择更多的点）。用这些从通道 1 中取得的对照点，以及它们相应的在通道 2 中的点，通过最小二乘法在两个坐标下可以分别建立关联二阶多项式。

在通道 1 下，测量所选择的对照点到其余 6 个对照点中相距最远的点之间的距离，这样就可以确定这一多项式在最终转换函数中能覆盖的范围。最后将所有的多项式以加权和的方式结合就可以得到最终转换函数（Goshtasby 1988）

$$f(x, y) = \frac{\sum_i W_i(R) P_i(x, y)}{\sum_i W_i(R)}$$

式中，

$$W_i = 1 - 3R2 + 2R3 \quad 0 \leqslant R \leqslant 1$$
$$W_i(R) = 0 \qquad R > 1$$

且

$$R = \frac{[(x - x_i)^2 + (y - y_i)^2]^{\frac{1}{2}}}{R_0}$$

这是在每个坐标中进行的。

MATLAB 的“cp2tform”命令能够迅速地同步完成以上计算并生成一种转换结构，该转换结构能够应用于其他 MATLAB 函数来实现转换要求。

对于这一转换过程误差的计算可以采用两种定义方式（Fitzpatrick et al. 2000）。基准配准误差（fiducial registration error，FRE）的计算最简单。使用已经建立的局部加权平均（LWM）映射函数——$f_{\mathrm{LWM}}$（$\mathbf{x}$），就可以将通道 2 中的对照点转换到通道 1 空间中，并且由下式计算 FRE：

$$\mathrm{FRE} = \left(\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}[\mathbf{x}_{i,1} - f_{\mathrm{LWM}}(\mathbf{x}_{i,2})]^2\right)^{\frac{1}{2}}$$

更为精确的定义是目标配准误差，获得目标配准误差需进行如下操作：首先选择一对对照点，然后用除了所选的这对对照点之外的其他对照点计算得到局部加权平均映射。将这一映射应用于先前所选对照点进行转换，就可以得到配准之后两点之间的距离，这一距离便是目标配准误差（TRE）。连续对各对对照点进行如上操作，然后用下列方程计算：

$$\mathrm{TRE} = \left(\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}[\mathbf{x}_{i,1} - f_{i,\mathrm{LWM}}(\mathbf{x}_{i,2})]^2\right)^{\frac{1}{2}}$$

一旦确定了转换形式之后，就可以应用于多种分析之中。例如，在单分子研究中，可用于将通道 2 中受散射极限限制的点的位置进行转换，从而与通道 1 中探针的定位进行比较。对尺寸大于单个探针的目标（如细胞）进行成像时，研究者也许期望能将通道 2 中的整幅图像转换覆盖到通道 1 中，通过目视来观察共定位图像。虽然目前还没有开发出 SHREC 在图像配准方面的应用，但使用 MATLAB 的“imtransform”函数可以简单地进行以上转换。

进行数据配准的目的之一在于研究发现酶的构象改变，以及测定分子间或分子内的

距离。在这类研究中，进行数据配准之后往往要测量距离。在探针定位和通道配准时产生的噪声会使距离分布概率呈现出非对称性（非高斯），如下（图 4-4）：

$$p(x) = \left(\frac{x}{\sigma^2}\right)\exp\left(-\frac{\mu^2 + x^2}{2\sigma^2}\right) I_0\left(\frac{x\mu}{\sigma^2}\right)$$

式中，$I_0$ 为有整系数 0 的调整后的贝塞尔方程；$x$ 为测定的距离；$\sigma$ 为相距 $x$ 的点的定位误差；$\mu$ 为探针之间的真实距离（Churchaman et al. 2006）。

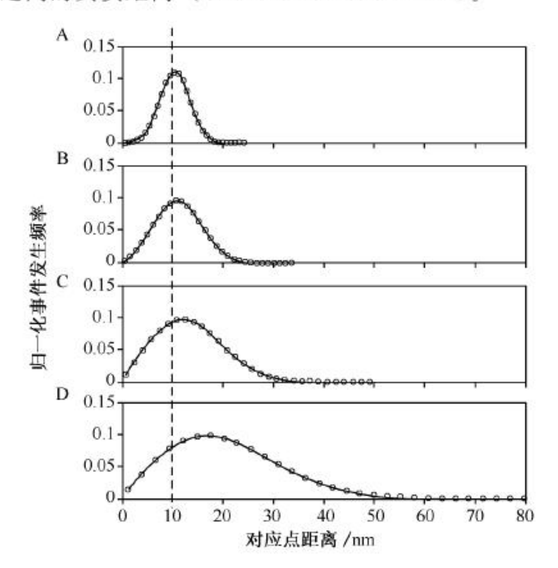



图 4-4　测定距离的非对称分布。测定的距离以 10 nm 的间距展示如图（点线）。A～D 分别代表在不同的信噪比下，斜率是如何随着信噪比而增大的。A～D 中信噪比 $\mu/\sigma$ 分别为 3.33、2、2.15 和 0.667。对这些分布进行高斯分析会得到不同于预估值的 $\mu$ 值，分别为 5%（A）、13%（B）、32%（C）和 112%（D）。

将测定距离的数据集代入上式可以求得对真实距离（$\mu$）的预估，相比于计算数据集合的平均值而言有更高的精确度。真实距离（$\mu$）和分布曲线最大值 $\langle x \rangle$ 的偏差，是测量误差 $\sigma$ 的函数

$$\langle x \rangle = \mu(1 + \sigma^2/[2\mu^2])$$

无论误差值为多少，其分布都是非对称的，并且其分布的平均值会系统地偏向于大数值方向。

## 实验方案：单荧光探针单分子高分辨率共定位

本方法用于获取基准数据，分析数据并计算图像通道之间的高分辨率映射。以下介绍用 TIRFM 系统激发荧光探针 Cy3 和 Cy5，并且进行成像。根据具体的研究要求需对本方法进行相应调整。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

基准荧光小珠（如 TransFluoSphere beads 533/620，100 nm；Invitrogen）
$MgCl_2$（1 mmol/L）

设备

玻片
MATLAB 软件程序 w/图像分析工具箱（The MathWorks，Natick，Massachusetts）
微量移液器管或者微量离心管
显微镜载物片，玻璃
根据所使用 TIRFM 的类型，可以使用石英显微镜载物片替代。
磁带（双面；如 Scotch，3 M）
全内反射显微镜（TIRFM）
相机，EMCCD（iXon DV 887 EMCCD；Andor Technology，Belfast，Ireland）
发射光滤光器（585/70 和 690/40）
可变光阑
激光（氦氖；25 mW，633 nm；JDS Uniphase，San Jose，California）< !>
激光（Nd：Yag；Compass 215 M，15 mW，532 nm；Coherent Inc.，Santa Clara，California）< !>
透镜（$f$=1.5 mm、50 mm、95 mm、120 mm、500 mm）
分光镜（595 LP 电子束分裂器，625 LP 电子束分裂器，532～632 nm 电子束分裂器；Chroma Technology Corp.，Rockingham，Vermont）
目镜
闭环双轴压力式纳米微位移工作台，装备有能够进行位置测定的电容传感器（Physik Instrumente，Auburn，Massachusetts）（可选，见步骤 7 iv～vi）
陷波滤波器（StopLine U-grade [OD 6] 532/17 nm；Semrock Corp.，Rochester，New York）
目镜（Olympus 1.65 NA 100×TIRE）
OD 滤光盘

1/4 波片（quartz multiorder λ/4 plate；Newport Corporation，Irvine，California）
刀片
微位移平台

## 方法

### 流动池构建和装载

1. 在显微镜载玻片上放置两张 1.5 in 长的双面胶，中间相隔 0.25 in 的间距。
2. 沿着胶带拖动另一显微镜载玻片的边缘，来确定胶带是否完全黏附在显微镜载片上。
3. 将一片干净的玻片置于胶带上方两条胶带中间的位置。
   保证玻片与显微镜目镜的折射率相匹配。
4. 用一个微量吸液器尖端（tip）或者微量离心管的底部温和摩擦玻片顶部接触双面胶的部位，保证密封。
5. 在水中稀释基准荧光小珠，并加入 $MgCl_2$ 至浓度为 1 mmol/L。
   没有 $MgCl_2$，荧光小珠不会黏附到玻璃表面。稀释倍数取决于基准荧光小珠储存液。稀释之后荧光小珠分布到玻片上，密度低于每视场面积一个荧光小珠。
6. 在流动池中加入 10 μl 溶液。

### 基准数据获取

7. 收集基准数据。
   使用标准位移台。
   i. 移动载有荧光小珠的玻片。
      黏附在玻片上荧光小珠的密度可以高于每视场面积一个荧光小珠。
   ii. 对载有荧光小珠的平面成像。
   iii. 移动平面继续对基准标记进行成像，直至获得满足要求的取样量。
      使用压力式纳米微位移工作台。
   iv. 寻找 1 或 2 个含有单个荧光小珠的视野，并对荧光小珠定位。
   v. 使用压力式纳米微位移工作台对网格化的荧光小珠逐步成像。
   vi. 在每一位点，对两个通道下的荧光小珠分别进行成像。如果相机受晶体管-晶体管逻辑电路（TTL）脉冲控制，那么这一成像过程就可以由定制的 LabView（National Instrument；Austin，Texas）程序完成。LabView 程序能够控制压力式纳米微位移工作台控制器的电压输入，从而调节工作台的位置，然后对相机发放 TTL 脉冲信号来进行成像。
      基准数据收集自动化能够大大减少用于收集数据的时间，从而降低对基准标记光稳定性的要求。

### 数据分析

尽管有很多方法可以分析基准数据（见正文），但使用 MATLAB 及其图像处理工具可以非常便捷地处理数据。下面介绍使用 MATLAB 计算局部加权均值（LWM）的规划算法。

8. 对每一通道下的图像位置定义变量如“cp _ channel 1”和“cp _ channel 2”。

9. 使用“cp2tform”命令转换数据：

```
tform_lwm=cp2tform(cp_channel1,cp_channel2,'lwm');
```

10. 计算转换相关的误差。

i. 计算基准匹配误差（FRE）：

```
trans_cp_channel2=rforminv(cp_channel2,tform_lwm);
FRE=sqrt(sum(sum((cp_channel1-trans_cp_channel2).^2))/(length(cp_channel1)));
```

ii. 计算目标配准误差（TRE）：

```
% find number of control point
number_cp=length(cp_channel1);
% loop through the control points
for i=1:number_cp
  % take out that control point
  remain_cp=[1:i-1 i+1:number_cp];
  % calculate the transformation without the ith control point
  tform_lwm=cp2tform(cp_channel1(remain_cp,:),
    cp_channel2(remain_cp,:),'lwm');
  % transform the left out control point with the above
    % found transformation
  trans_cp_channel2(i,:)=tforminv(cp_channel2(i,:),tform_lwm);
end
TRE=sqrt(sum(sum((cp_channel1-trans_cp_channel2).^2))/(length(cp_
  channel1)));
```

### 使用 MATLAB 应用配准映射进行后续数据分析

11. 对于单分子数据：

```
point_channel2_trans=tforminv(point_channel2,tform_lwm);
```

12. 图像匹配：

```
image_channel2_trans=imtransform(image_channel2,tform_lwm);
```

## 未来发展方向

使用SHREC技术对图像进行改进可以提高共定位的分辨率。这主要是通过在成像时提高信噪比，降低基准标记的共定位误差来实现的。照射金颗粒、银颗粒或者塑料颗粒的散射光相比荧光颗粒可以提供更多光子，并且不会发生光猝灭。本实验室手册的第9章介绍了照射金颗粒并进行成像的技术。此外，制造CCD的技术也可以降低基准数据获取时的背景噪声。而信噪比增加时，就需要用二维高斯方程对图像进行二维线性拟合，即便最终二维高斯方程不再是点扩散方程的最好近似。如果基准定位可以获得更高的分辨率，就可以使用基准标记对视场中更多的点进行取样。

## 参考文献


Axelrod D., Burghardt T.P., and Thompson N.L. 1984. Total internal reflection fluorescence. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13:** 247–268.

Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., and Hess H.F. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313:** 1642–1645.

Cheezum M.K., Walker W.F., and Guilford W.H. 2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* **81:** 2378–2388.

Churchman L.S., Flyvbjerg H., and Spudich J.A. 2006. A non-Gaussian distribution quantifies distances measured with fluorescence localization techniques. *Biophys. J.* **90:** 668–671.

Churchman L.S., Okten Z., Rock R.S., Dawson J.F., and Spudich J.A. 2005. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 1419–1423.

Donnert G., Keller J., Medda R., Andrei M.A., Rizzoli S.O., Luhrmann R., Jahn R., Eggeling C., and Hell S.W. 2006. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 11440–11445.

Fitzpatrick J.M., Hill D.L.G., and Maurer Jr., C.R. 2000. Image registration. In *Handbook of medical imaging,* vol. 2. *Medical image processing and analysis* (ed. J.M. Fitzpatrick and M. Sonka), pp. 447–513. SPIE, Bellingham, Washington.

Goshtasby A. 1988. Image registration by local approximation methods. *Image Vision Comput.* **6:** 255–261.

Gustafsson M.G. 1999. Extended resolution fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9:** 627–634.

———. 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 13081–13086.

Hess S.T., Girirajan T.P., and Mason M.D. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM). *Biophys. J.* **91:** 4258–4272.

Koyama-Honda I., Ritchie K., Fujiwara T., Iino R., Murakoshi H., Kasai R.S., and Kusumi A. 2005. Fluorescence imaging for monitoring the colocalization of two single molecules in living cells. *Biophys. J.* **88:** 2126–2136.

Lacoste T.D., Michalet X., Pinaud F., Chemla D.S., Alivisatos A.P., and Weiss S. 2000. Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9461–9466.

Michalet X., Lacoste T.D., and Weiss S. 2001. Ultrahigh-resolution colocalization of spectrally separable point-like fluorescent probes. *Methods* **25:** 87–102.

Rust M.J., Bates M., and Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3:** 793–795.

Schmidt M., Nagomi M., and Hell S. 2000. Subresolution axial distance measurements in far-field fluorescence microscopy with precision of 1 nanometer. *Rev. Sci. Instrum.* **71:** 2742–2745.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82:** 2775–2783.

van Oijen A., Kohler J., Schmidt J., Muller M., and Brakenhoff G. 1998. 3-dimensional super-resolution by spectrally selective imaging. *Chem. Phys. Lett.* **292:** 183–187.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.


（张筱敏　译）

# 第5章　交替激光激发的单分子检测

**Achillefs N. Kapanidis**[*]　**Mike Heilemann**[*]　**Emmanuel Margeat**[†]
**Xiangxu Kong**[‡]　**Eyal Nir**[‡]　**Shimon Weiss**[‡]

[*] Department of Physics and IRC in Bionanotechnology, Clarendon Laboratory, University of Oxford, Oxford, OX1 3PU, United Kingdom; [†] CNRS UMR-5048, Centre de Biochimie Structurale, and Universite Montpelliers 1 et 2; INSERM U554, F34090 Montpellier, France; [‡] Department of Chemistry and Biochemistry, Department of Physiology, and the California NanoSystems Institute, University of California, Los Angeles, California 90095

## 摘要

我们描述了一种新的单分子荧光方法，这种方法使用交替激光激发单个生物分子来研究它们的结构、相互作用，以及动力学。这一过程可以通过应用荧光强度比例而得到感兴趣分子之间的距离以及分子比来实现。交替的原则是与数个时间尺度兼容，允许监测快速动力学或者大量的单分子。实验方案和基本原则在此给出，用于建立方案并准备样品，从而对扩散或静止的分子做最基本的分析，还会给出数据分析的基本原则。

## 概述

单分子荧光共振能量转移技术（smFRET）（Ha et al. 1996）是监测蛋白质相互作用和构象变化的一种最流行的单分子方法。它的应用已经提供了关于生物机器和机制的新的重要信息（Ha 2001，2004）。在一个典型的 smFRET 实验中，一个单分子或标记着供体-受体 FRET 对的复合物被暴露在供体的激发光下。在鉴定信号来自单分子之后，FRET 关联的信号（来自供体和受体荧光团）反映出探针之间接近了。这一信息总结在一维 FRET 柱状图上（图 5-1），这个图反映了生物分子结构、静态和动态的区别的存在，以及生物分子构象改变的动力学（见第 2 章）。

FRET 最近拓展到应用交替激光激发（ALEX）（Kapanidis et al. 2004，2005a；Laurence et al. 2005；Lee et al. 2005；Nir et al. 2006），这为感兴趣分子中供体和受体荧光团的状态提供额外和直接的信息。这额外的信息引出了多维的 FRET 柱状图和荧光团化学计量数，从而分别反映分子结构和化学计量数。ALEX 起初的应用集中在研究基因转录（Kapanidis et al. 2005b，2006）以及蛋白质折叠（Laurence et al. 2005）。就像传统的 smFRET，ALEX 可应用于扩散的和静止的分子。扩散分子可以在溶液中、胶中或者带孔材料中研究；静止分子可以用共聚焦显微镜以及扫描显微镜或全内反射宽场显微镜（TIR）研究（Margeat et al. 2006）。

本章描述了在溶液和表面的基于 ALEX 的单分子方法，以及基于应用于不同时间尺度交替的方法。这里还给出了建立对于扩散和静止分子基本分析方法的建议，以及基

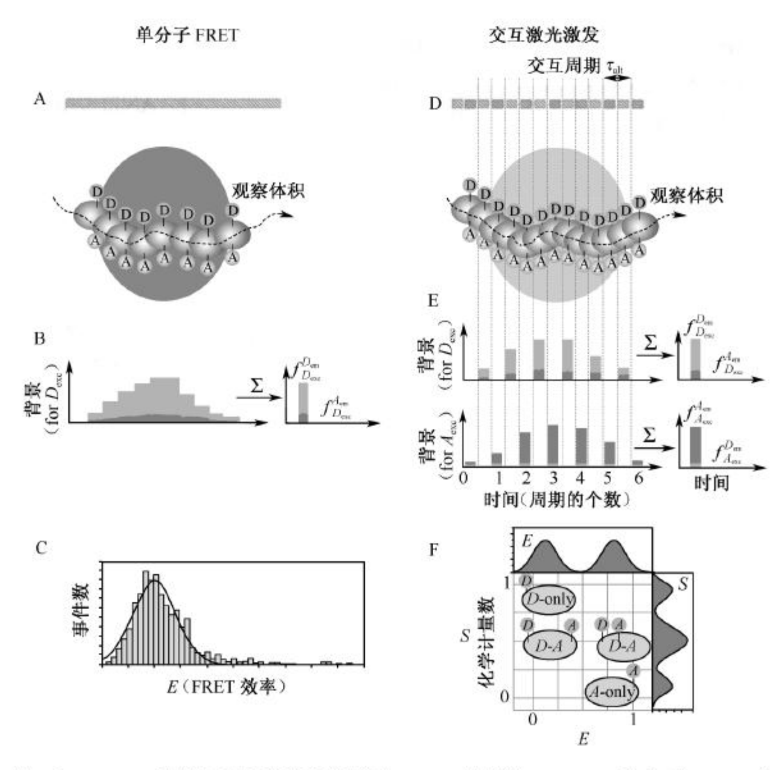



图 5-1 ALEX 的概念和与单激发单分子 FRET 的比较。A～C. 单分子 FRET 应用单激光激发；以扩散分子为例。一个荧光分子横穿一个聚焦的绿色激光柱并在供体和受体发射波中释放质子。这两个波长中的质子数用于产生一维的 FRET 效率 $E$ 的柱状图。D，E. 单分子 FRET 应用交互激光激发。一个荧光分子横穿一个观察体积，在交互模式下用聚焦的绿色和红色激光照射。对于每个激光激发，应用受体和供体发射波中的质子数，我们可以产生一个二维的效率柱状图 $E$ 以及相对的荧光团分子比，实现分子分类。

本的数据处理方法。还详细描述了如何制定标准以校正和评估装置的敏感性。最后，描述了在纳秒级时间尺度应用 ALEX 的基本原则，这是一种将 ALEX 与时间分辨的 FRET 结合的方法（Laurence et al. 2005；Muller et al. 2005）。本章的结尾有一系列 μs-ALEX 和 ms-ALEX 的实验方案（本章缩写的见表 5-1）。

**表 5-1 缩写的解释**

| 缩写 | 英文全称 | 中文解释 |
|---|---|---|
| ALEX | alternating-laser excitation | 交替激光激发 |
| AOM | acousto-optical modulator | 声光调制器 |
| AOTF | acousto-optical tunable filter | 声光可调滤波器 |
| APBS | all-photons burst search | 全光子短暴搜寻 |
| APD | avalanche photodiode | 雪崩光电二极管 |

续表

| 缩写 | 英文全称 | 中文解释 |
|---|---|---|
| BSA | bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| CW | continuous wave | 连续波 |
| DCBS | dual-channel burst search | 双通道短暴搜寻 |
| DCLP | dichroic long pass | 二色长通 |
| DM | dichroic mirror | 二色镜 |
| DRLP | dichroic reflector long pass | 二向色反射长通 |
| *E* | FRET efficiency | FRET 效率 |
| EOM | electro-optical modulator | 电光调制器 |
| FCS | fluorescence correlation spectroscopy | 荧光相关光谱学 |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer | 荧光共振能量转移 |
| KOH | potassium hydroxide | 氢氧化钾 |
| NA | numerical aperture | 数值孔径 |
| OD | optical density | 光密度 |
| PIE | pulsed interleaved excitation | 脉冲交替激发 |
| *S* | stoichiometry | 化学计量数 |
| smFRET | single-molecule FRET | 单分子荧光共振能量转移 |
| TCSPC | time-correlated single-photon counting | 时间相关的单光子计数 |
| TIRF | total internal reflection fluorescence | 全内反射荧光 |
| TTL | transistor-tranistor logic | 电晶体-电晶体逻辑 |

## 基本概念和 ALEX 的考虑

单激发的 FRET 测量了光子数 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$，这里 $f_X^Y$ 是一个单分子在波长 $X$ 激发并在 $Y$ 波长下检测到的光子数（这里 $D_{exc}$ 是 FRET 供体的激发波长，$D_{em}$、$A_{em}$ 分别是 FRET 供体和配体的发射波长；见第 2 章）。ALEX 提供了另一种非零光子计数—— $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$，受体发射与受体激发的对应（Kapanidis et al. 2004；Lee et al. 2005）。这三种计数可以计算接近比例 $E_{PR}^{raw}$ 和相对荧光团分子比 $S^{raw}$

$$E_{PR}^{raw}=\frac{f_{D_{ex}}^{A_{em}}}{f_{D_{ex}}^{A_{em}}+f_{D_{ex}}^{D_{em}}}$$

$$S^{raw}=\frac{f_{D_{ex}}}{f_{D_{ex}}+f_{A_{ex}}}=\frac{f_{D_{ex}}^{D_{em}}+f_{D_{ex}}^{A_{em}}}{f_{D_{ex}}^{D_{em}}+f_{D_{ex}}^{A_{em}}+f_{A_{ex}}^{A_{em}}}$$

额外的信息在二维柱状图中总结了（图 5-1），而且得出了有效的分子分类。分类可以去除使得 FRET 复杂化的假象（如出现无活性的 FRET 供体和受体的状态，复杂荧光团分子比的状态）同时引入了新的可以观察的实体，如只有荧光受体的群体，这将有利于估算分子的相互作用。

要解决的生物问题的特性和时间尺度以及所需的测量的敏感性决定了 ALEX 的变化尺度。关于生物系统平衡观点的基本实验（以及几分钟时间内的动力学）可以通过微秒级 ALEX（μs-ALEX），用激光在微秒尺度的调控来实现，这可以提供扩散分子的快照。另一方面，对于非平衡的实验，以及分钟尺度的多分子动态电影，我们可以把图像与激光调节在毫秒尺度结合运用。这个方法，也就是所谓的毫秒 ALEX（ms-ALEX），可以把激光的改变与 TIRF 显微镜结合。最后，为了探测快速的动态并重新获得距离分布，我们可以应用纳秒级 ALEX（ns-ALEX）的方法，这是在纳秒尺度通过使用来自脉冲激光源的交替脉冲实现激光变换的方法。

如同在单分子 FRET 实验中，典型的基于 ALEX 的方法需要标记分子浓度为亚纳摩尔级以保证单分子分析。此外，荧光探针需要引入到感兴趣的分子上，而且需要用实验证明荧光团没有干扰功能。最后，荧光团的漂白为静止分子的观察设定了限制，尤其是不存在氧化清除剂和化学添加剂的时候。关于生物连接化学和与单分子兼容的荧光团的信息见 Kapanidis 和 Weiss（2002）与 Jager 等（2005，2006）。

## 微秒级 ALEX（μs-ALEX）：建立、校准及设备验证

为了为 μs-ALEX 建立双激光、双探测器设备，我们把系统分为三个基本模块：①激发模块，产生交变激光并照射到样品上；②载物台和物镜模块（往往是一个倒置显微镜），它支持样品并允许有效的样品激发以及荧光发射的收集；③发射模块，它收集、计数，并放大激发的光子（图 5-2）。这里，我们描述了如何建立单分子，如何整合它们，并如何校准完整的系统。

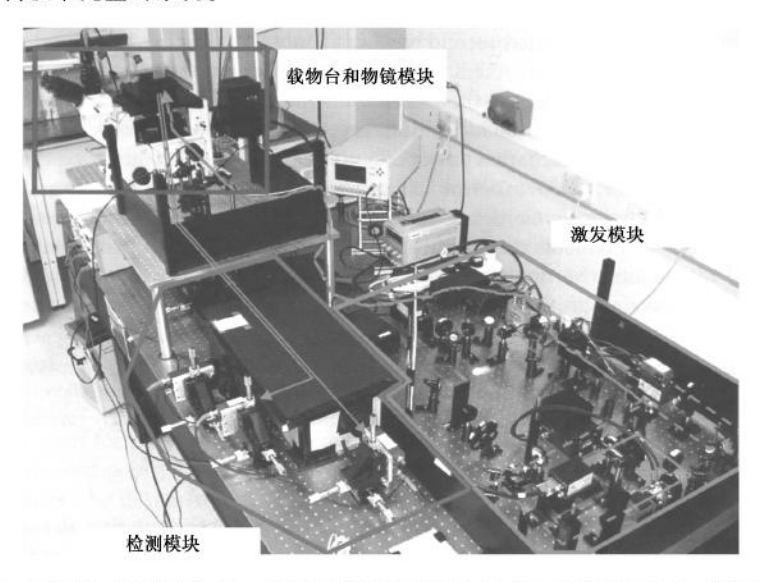



图 5-2　双激光 ALEX 的建立。三个基本模块被标出了（激发、载物台和物镜、检测模块）。

## 激发模块

ALEX 系统激发路径的主要元件是激光源、调制设备及激光混合设备（图 5-3）。选择激发波长、滤色镜以及二色镜对把单个检测窗内的荧光团最大化和使散射带来的背景信号最小化很重要。两种主要的散射来自 Rayleigh 散射（如弹性散射，它导致监测的光子处在与激发波长相同的波长）和拉曼散射（如非弹性散射，因为它导致监测到的光子处于比激发波长更长的波长）。例如，水的拉曼散射在 532 nm 激发下产生约 650 nm 的光子，在 635 nm 激发下产生约 810 nm 的光子。

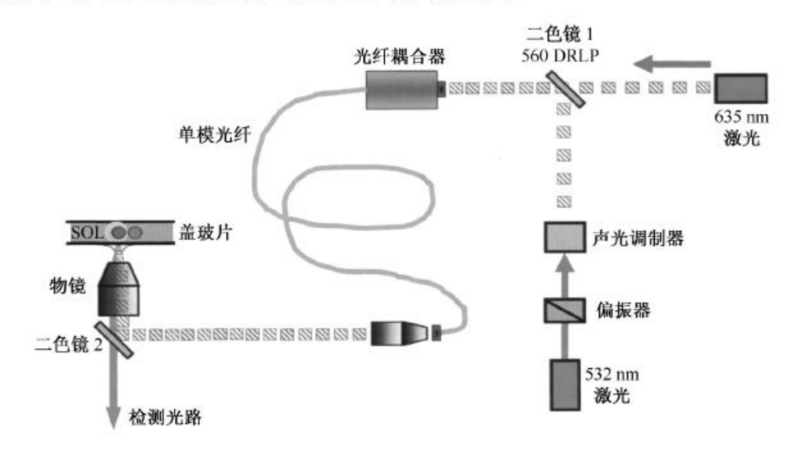



图 5-3　ALEX 的激发模块：635 nm 激光（直接调制和线性极化）和 532 nm 激光。（POL）偏振器；（AOM）声光调制器。激光束与三个镜子重叠（M1、M2 和 M3），二色分光器（DM1，560DRLP）在光纤耦合器（FC）内，它连到一个单模光纤上；10 倍的物镜作为纤维的输出单元；双波段的二色镜（DM2）通过油镜传输光（NA 1.45，60×或 100×）。

**激光**

各种可以获得的激光可以从很多方面分类。首先，激光可以分为连续波（CW）和脉冲激光。因为 μs-ALEX 的操作是应用微秒尺度的调制，只有连续波激光在此讨论（对于脉冲激光，看下文，搭建 ns-ALEX 装置：主要的考虑点）。此外，激光可以按照物理原理和产生激光的材料分类。气体激光（如氩离子激光、氦氖激光）、固体激光（如 Nd∶YAG），还有二极管激光也很流行。

激光激发的功率达到 5 mW 就应该可以充分满足对扩散分子的实验。50 mW 的功率可以与 TIRF 结合（见第 2 章和下文，毫秒级 ALEX：在毫秒尺度监测构象的动态）。任何满足这些要求的激光都可以选择，但是简单有效的固体激光更好。作为选择，二极管激光（见下文对调制的讨论）更为吸引人，它简化了光路系统、校准和控制。

警告：大多数情况下，ALEX 所用的激光属于 IIIB 类（是国际激光安全标准 IEC60825 的基础）。遵守激光安全指南很重要，它包括总的安全原则和特别的规则。应该在建立 ALEX 系统前联系激光安全管理员并请他帮助评估风险和给予安全指导。

**调制**

主要有三种调制激光发射的方法，取决于激光（二极管、固态、气态）和需要（频率和上升时间、成本、使用难易）。

1. 直接调制：这是通过 TTL 信号（晶体管-晶体管逻辑，它提供一个标准化的数字信号）的电子调制，它可以达到高达 100 MHz 的高频率（对于二极管激光）和短的响应时间（2 ns）。直接调制的二极管激光提供了最方便的选择，不需要其他的光学元件，但是目前这只适用于小于 475 nm 或大于 635 nm 的波长。二极管激光泵的固体激光达到 100 kHz 的调制频率预计不久将被应用，这将填补直接调制的二极管激光光谱的空缺［见 Kong 等（2007）］。
2. 声光调制：这个容易校准和操作，频率可以高达 15 MHz 而响应时间约为 25 ns（用高锰酸铅作为材料）。一个声光调制器（AOM）并不贵，而且应用所有类型的线性 CW 激光都可以，这样就使得建立系统更加灵活。类似于 AOM，声光可调滤波器（AOTF）也可以用，实现通过选择性偏转调节多个波长［见下文（毫秒级 ALEX：在毫秒级监测构象的动态）和 Nir 等（2006）与 Ross 等（2007）］。
3. 电光调制：基本的电光调制器（EOM）可以达到约 1 MHz 的频率和约 100 ns 的响应时间，这可以满足 μs-ALEX 的要求；大多发表的 ALEX 工作是基于电光调制的。但是，这个方法很贵而且需要额外的光学元件（1/4 波片和半波片）和空间。如果同样的系统用于极化调节光谱，那么使用 EOM 是必要的。

所有的调制设备可以通过软件控制的 TTL 或类似信号（见实验方案 1）来处理。当调制频率在 10～100 kHz 时，所有这些选择可以很好地为 μs-ALEX 工作。但是，如果可以，直接调制激光是最简单的选择。如果这个选择不可行（对于 532 nm 的固态激光），就选择声光调制。

**激光的组合**

为了保证最佳的重叠，激光束应该被耦合到单模光纤中（宽带的单模光纤的好处在于最低的横向电磁激光模式的专门传播［$TE_{00}/TM_{00}$］，这将保证一个对称的、接近高斯分布的激发曲线）。一个支持 $TEM_{00}$ 的、可见光范围的单模光纤最好不过（如 thorlab 型），激光束通常用二色分光器来混合（如 532 nm 和 635 nm 的 560DRLP），并且偶联到单光纤偶联单元。这个方法既灵活又便宜，但是可能引起比较低的光纤偶联效率，因为它需要匹配两个激光的校准以保证两个焦点在光纤耦合器的同样位置。一个光纤连接的复用器（一个含有分离的对不同激光的耦合单元的设备，包括一个二色镜分光器，而且连着一根输出光纤）提供一种有趣但不很灵活的选择，需要的波长必须在购买时指明。这两种方法把激光合并到一个单模光纤中，这样提供了激光束的最大限度重合。输出纤维连接到一个光纤耦合单元，或者到一个 10～20 倍的物镜，放在一个 $x$，$y$，$z$ 三维定位器上来校准激光并产生一束光以使其直径与物镜的后孔径匹配（见下文）。

## 载物台和物镜模块

载物台和物镜一般包括一个配置了用于耦合激光的侧孔或后孔的倒置显微镜（没有显微镜，装备仍然可以建立，但是校准就难了，成像细胞的能力不能获得，而且一些常规的部分必须设计和建立。但是，没有显微镜的方法允许更好的机械稳定性和 ALEX

装备的最小化)。显微镜装备二色镜以便把激发光导向物镜的后孔并指向样品。荧光发射被聚焦的物镜收集，传输通过二色镜，并指向设备的监测模块。

**物镜**

有高数值孔径（NA）的物镜一般用于单分子监测，一个大的收集角度可以有效检测到来自随意取向的荧光团的光子。对于溶液中的 μs-ALEX，油镜头（NA 1.3～1.45）提供最大的收集效率，但是工作距离有限（溶液中 0～20 μm）。高数值孔径的水镜（NA＝1.2）提供大的工作距离（水中达到 50 μm）并减少相差（接近理想的点扩散函数)。物镜一般从显微镜供应商处订购以确保兼容。

**二色分光器**

分光器的目的是让激发光通过物镜的后孔径到样品上并把发射光传递到检测路径。对于 ALEX 的应用，商业途径得到的多色分光器（或者 AOTF，见前文，调制部分，以及下文，毫秒级 ALEX：在毫秒尺度监测构象的动态）用来保证几条激光同时被反射和传递。

**显微镜台和温度控制**

溶液中 ALEX 实验不需要纳米方位台和带马达的台子。一个 *x-y* 方向的机械显微镜平台用于放置样品，它一般放置在一个 5～100 μl 的小空间内，用一个打孔的塑料垫圈放置于两个玻璃片之间构成。温度控制通过冷却或加热设备实现，或者通过商品化的温度恒定的样品室罩在显微镜外面。

**实验板**

很多情况下，荧光发射连到显微镜的下端口。这需要用一个带有环形开口的和显微镜低口匹配的实验板把显微镜提升 30 cm，还需要光学台上 4 个支脚。

## 发射模块

离开显微镜的荧光通过下部开口到检测模块（图 5-4）。在显微镜的下部开口之后，一个针孔位于镜头的焦面上（这是桶形镜头，焦距的长度从制造商得到。通常，焦点接近显微镜的下部开口）。针孔就位于 *x-y* 方向的定位器上并带有一个微米尺，用来定位。这对第一次的校准很有用，探测器不需要针孔来校准。

除了用于封闭针孔的最少溶液，我们建议安装一个轮盘上面有一些选定尺寸的针孔和一个没有针孔的空白位置。这可以实现简单的逐步的针孔校准（从大到小），并且与 *x*，*y*，*z* 的定位结合，增加准确性和稳定性。这个选择需要用第二个镜头进一步把焦点投影，因为光机元件需要更多空间。

在针孔之后，光用另一个镜头校准并用一个单带宽的二色分光器在光谱学上分离。结合检测器前的发射滤片，这些元件会与荧光团和系统的光谱特征相匹配（如消除激发光和拉曼散射产生的背景)，从而保证了有效地监测到选定的荧光团。点源检测器可以用于 ALEX。这些检测器经常是雪崩二极管（APD，也就是单光子雪崩二极管或 SPAD)，呈现低的电子背景噪声（称为暗噪声，因为实际检测不到光子）和对单光子的有效检测。单光子达到检测器的有效区域产生一个电信号，它被传送到周边元件关联板（PCI，如 PCI-6602，National Instruments 生产)，然后被获取软件处理。总的来说，光子放大管是可用的，但它们检测光子效率较低，使得它们不太适合使用。

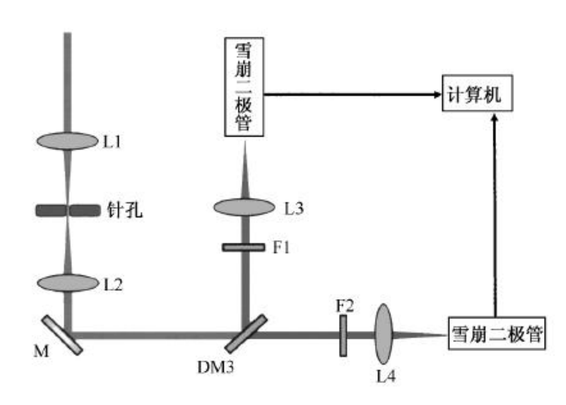



图 5-4　ALEX 的发射模块。荧光发射通过物镜收集并且通过样品载物模块的 DM，用镜头 L1 聚焦到针孔（PH），用镜头 L2 产生平行光并且用二色分光器 DM3（650 DRLP）按照波长分离。光通过滤片 F1（585DF70）和 F2（650LP）来选择发射光谱。镜头 L3 和 L4（20 mm 的焦距）聚焦在检测器的有效区域（APD1 和 APD2）。

让检测模块与外界的光隔离非常重要，要用一个黑箱屏蔽这个模块（如用黑色的板子作成的）。

### 组装 μs-ALEX 装置

实验方案 1 提供了一个详细的组装设备的描述。对于 μs-ALEX，每个光子到达的时间用一个计数板来测量，它可以在纳秒级分辨率探测到来自每个探测器的 TTL 脉冲的到达（如 PCI-6602 计数板，National Instruments 生产；分辨率＝12.5 ns）。光子分配到一个激光的激发时间由后验得到，基于准确的光子到达时间和 PCI 板的内置时钟。这需要计数任务和激光模块同步，如当方波传到调制器时，数值要从零开始。如果数据获取板由一个简单的 TTL 脉冲激发，这会很简单：如调节波形-输出的板首先送出一个 TTL 脉冲到计数板和它本身，同时两块板被编程而开始根据这个 TTL 脉冲获取或者输出它们各自的信号。或者，对于 National Instruments 生产的板，可以用一个内置总线（RTSI）传输并感知这个激发脉冲。

与声光或直接调制不同，EOM 和 AOTF 需要一个平行的输出信号而不是 TTL 信号。在这种情况下，一个平行的 PCI 板是必要的（如 NI-6711 或 NI-6713，National Instruments 生产），而且，要与计数板同步。需要驱动 EOM 或 AOTF 的电压取决于模块；信息在制造商的手册中有。

## μs-ALEX：样品准备和数据获取

对于单分子的灵敏度，仔细调试设备很重要。实验方案 2 描述了这个过程。

### 样品准备

应用 μs-ALEX 通过激光聚焦溶液中可以观察单个荧光团。样品需要稀释以确保

能检测到单分子，实际上，这需要荧光分子的浓度为 100 pmol/L。在一个给定时间，在一个聚焦体积内检测到的荧光分子的概率一定要低。实验方案 3 提供了详细的信息。

## 数据分析

### 短暴搜寻

因为单分子测量要用浓度为 100 pmol/L 的荧光分子，一个荧光分子只是在 10%的时间内占有成焦体积；在余下的 90%的时间，检测到的光子为背景光子。这个背景，强度为每秒几千个光子（几个千赫兹），主要是水和缓冲液的拉曼散射、荧光分子在焦点边缘的扩散，以及光反射。这些贡献并非暗噪声。在荧光分子通过成焦体积的传输时间内（约 1 ms），有限数量的激发/发射循环产生，导致荧光光子的暴发。这个荧光暴发就是单个扩散分子的可视化结果。当分析光子流的时候，我们需要区分背景光子和暴发出的光子，并分配暴发的起止（图 5-5A）。

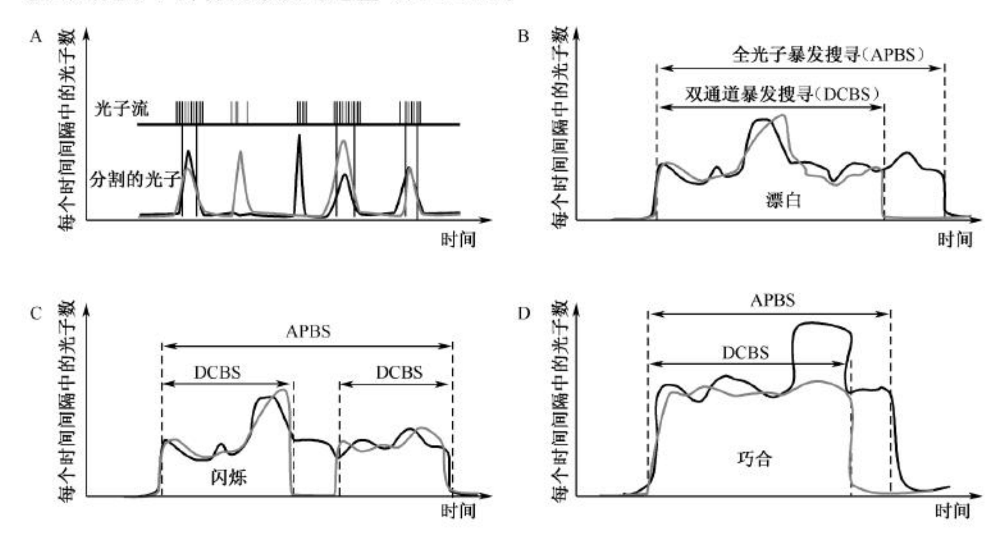



图 5-5 全光子暴发搜索（APBS）与双通道暴发搜索（DCBS）的比较。（深色线）供体激发期内，供体发射与受体发射光子的和；（浅色线）受体激发期内检测到的受体发射光子。A. 光子流和分割的时间轨迹。B. 受体漂白情况：受体在暴发末尾漂白。APBS 把所有监测到的光子看做同一个暴发，并且导致 FRET 的计算结果比真实值低。DCBS 把暴发截至在漂白一步，产生了准确的 FRET 值。C. 受体闪烁现象：在暴发中的受体闪烁。APBS 得到的 FRET 值偏低，而 DCBS 得到两个连续的较小的暴发而得到准确的 FRET 值。D. 随机的巧合：在暴发末尾，受体-供体对与只有供体的分子混合在一起。APBS 混合所有光子与一个暴发，产生了不准确的 FRET 值。DCBS 去除了一些只有供体的光子，得到更准确的 FRET 值。

#### 固定 BIN 的短暴搜寻

从背景光子中分离荧光的简单方法是用所谓的“Box-Filter”搜索计算方法。在这个搜索中，光子到达的时间记录被放入固定的时间间隔（bin）（Deniz et al. 1999）。用

单光子阈值（每个时间间隔内最少的光子数），比阈值光子数少的时间间隔被忽略，而比 bin 光子数多的被鉴定并留下进一步分析。典型的搜索参数对于标准荧光团来说，时间间隔在 500 μs 内，并阈值为 5～20 个光子。这种计算缺少固定时间间隔之间的校正和随机出现的暴发，因为一个暴发（从一个单分子）可以被分为两个时间间隔。而且，一个时间间隔可以含有的主要是背景光子，而不光是光子暴发。这个方法不能有效用于双通道的暴发搜索（见下文），因为它不能检测受体和供体分子失活的确切时间。

**滑动的短暴搜寻**

滑动暴发搜索是 Seidel 和同事提出的另一种方法（Eggeling et al. 2001）。在这个搜索中，至少 $L$ 个连续光子在以它们到达中心长度 $T$ 时间窗内至少有 $M$ 个相邻光子才被定义为一个暴发。满足这个标准的最先和最后的光子分别定义为开始和结束光子。典型的搜索参数是 $L=10\sim50$，$M=2\sim10$，$T=100\sim1000$ μs。这个暴发中的光子是供体激发期间，受体激发期内，或所有激发期内检测到的光子（全光子暴发搜索或 APBS）（Nir et al. 2006）。

**基于 ALEX 的短暴搜寻**

因为 APBS 鉴别暴发，而不管激发光和发射光的波长，它会导致正在通过共聚焦焦点漂白或眨眼的分子的 FRET 值不准确。基于 ALEX 的暴发搜索可以去除这类事件；这里滑动的暴发搜索专门用于①在供体激发期检测到的光子，说明了供体出现并有光活性的时间段；②受体激发期的光子，说明了受体出现并有活性的时间段（见图 5-5B～D）。在这个暴发搜索中，如果光子的到达时间与时间间隔 1 和 2 重合，光子被当作暴发的一部分。当两个荧光团具有光活性（这样可以除去 FRET 分布的偏差），这个条件可以保证鉴定到光子的暴发。交替激光的周期比滑动窗要短得多。我们称这个搜索为双通道暴发搜索（DCBS），其中双通道代表供体激发对受体激发（而不是供体发射对受体发射）。典型的搜索参数是 $L=5\sim25$，$M=2\sim10$，$T=100\sim1000$ μs。DCBS 的一个子集单独监测了在扩散分子中受体的出现和状态（Kapanidis et al. 2005b）。

## ALEX 相关的柱状图和影响因素

在暴发搜索和鉴别之后，我们可以计算两个荧光的比例：每个暴发的接近比例 $E_{PR}^{raw}$ 和化学计量数 $S^{raw}$（见上文，基本概念和 ALEX 的考虑，以及下文，微秒级 ALEX：测量准确的 FRET 效率）。在这一部分，我们用 $E$ 和 $S$ 分别代表两个比例并在其中做出纠正。对于一个完整的处理，见下文（μs-ALEX：测量准确的 FRET 效率）和 Lee 等（2005）。这两个比例绘成了二维的柱状图，以及两个一维的柱状图（把二维的柱状图投影在接近比例轴上和化学计量数轴上）（图 5-6）。对于更好的表示，结果就是“格子化”，经常通过把 $E$ 和 $S$（0.00～1.00）的整个范围分割为 50～100 个格子。为了从二维柱状图中抽取可靠信息，我们需要理解柱状图如何被统计流动、分子动态以及实验条件这类因素所影响。当需要最小波动的柱状图时（如当 FRET 柱状图用于抽取距离分布和动力学），需要尽量减少假象。部分来说，可以用双色暴发搜索来实现（图5-6）。

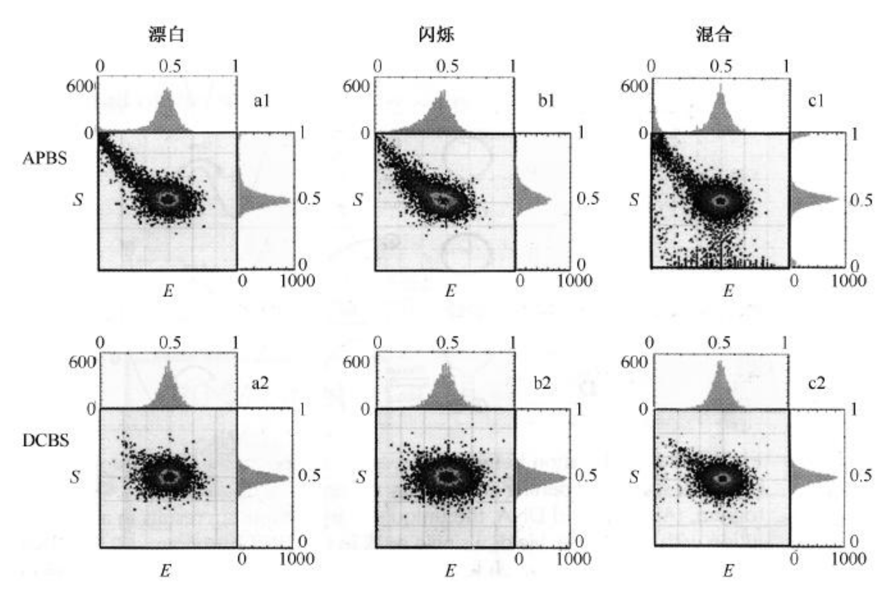



图 5-6　二维 $E$-$S$ 柱状图上漂白、闪烁和随机事件的激发效应：全光子暴发搜索（APBS；上行）与双通道暴发搜索（DCBS；下行）的比较。漂白（左）和闪烁（中）：对于两种情况，APBS 反映了连接只有供体群（$E=0$，$S=1$）和感兴趣的群体（$E=S=0.5$）的轨迹。DCBS 消除了这种暴发，产生了对称的高斯状 $E$ 和 $S$ 的分布。随机事件（右侧）：APBS 反映了从供体-受体群到只有供体群以及到只有受体群的暴发的轨迹（$S=0$）。DCBS 消除了大部分这种暴发，得到了对称的高斯分布状的 $E$ 和 $S$ 分布（Nir et al. 2006）。

**发射噪声**

在没有假象的情况下，影响 $E$-$S$ 柱状图中点群形状和宽度的主要因素是 $D$-$A$ 的距离分布和发射噪声（统计流动和噪声）。如果 $D$-$A$ 距离被固定且对于所有分子相等，那么，柱状图的形状和宽度将是一个平均值附近光子数统计波动的结果。例如，如果我们假设 $E$ 是 0.5，而且所有暴发都有 100 个光子，那么，由于统计噪声，实际的受体光子数将在 50 附近变化 [因为 $E=f_{D_{ex}}^{A_{em}}/(f_{D_{ex}}^{A_{em}}+f_{D_{ex}}^{D_{em}})=0.5$，当 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}=f_{D_{ex}}^{D_{em}}=50$]，但不会总是等于 50。因为供体和受体发射的随机性质，平均值附近的波动可以用二项式性质来描述且依赖于暴发的大小（如一次暴发中受体和供体光子总数的和）以及暴发中的一个光子是一个受体光子的概率。如果没有背景和交叉串扰的光子（或者在解释了这种分布后），后一种可能性与 $E$ 值相等（Lee et al. 2005；Nir et al. 2006）。此外，在真实的单分子荧光实验中，暴发没有固定的大小，而是一个大小的分布。因为很难预测这个分布，就用经验化的暴发分布来做这个发射噪声的二项式计算。FRET 柱状图宽度和形状的估算，以及接下来与实验柱状图的比较修复了 FRET 柱状图的宽度和形状，而且对于提取 $D$-$A$ 距离分布是必要的。

**分子动态**

FRET 的柱状图还被分子动态影响（图 5-7）。例如，一个 $D$-$A$（供体-受体）距离固定的刚性分子产生的 FRET 柱状图的宽度只是取决于发射噪声（图 5-7A）。一个有高

能垒的存在两种状态的发卡结构，在两种 *D-A* 距离之间变动得慢，并且产生带有两个独特峰的 FRET 柱状图（图 5-7B）。一个有低能垒的存在两种状态的发卡结构，在两种 *D-A* 距离之间变动得快（与扩散时间相比），并产生一个峰的 FRET 柱状图，它是两个 FRET 极值的平均值（图 5-7C）。一个有中等能垒的带有两种状态的发卡，以类似扩散的时间尺度在两种 *D-A* 距离间波动，并产生带有两个峰的且之间有一座桥的 FRET 柱状图（图 5-7D）。以距离分布、动力学、FRET 柱状图之间的关系为基础，我们可以提取分子相互转换速率以及 *D-A* 距离分布。

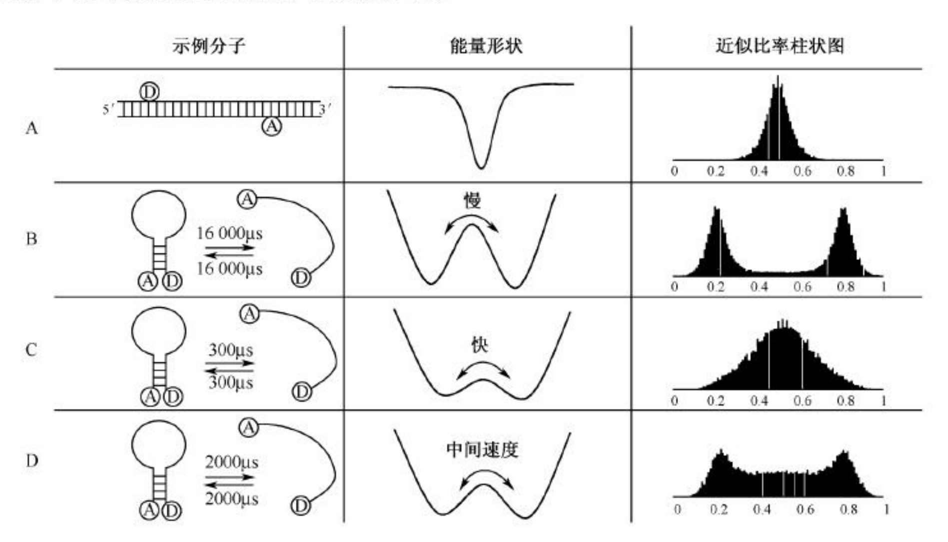



图 5-7　对于双状态系统的能量分布和 FRET 柱状图之间的关系。（左）分子开放和闭合。（中间）能量图。（右侧）激发的有限发射噪声的 FRET 柱状图。A. 对于刚性 DNA，能量的最小化导致距离的分布，产生了单峰 FRET 柱状图；B. 对于开放和闭合时间尺度比典型扩散时间（约 1 s）长得多的 DNA 发卡，每个分子实际上被固定在两个能量最低点；C. 当两个能量最低点之间的能垒比较低时，DNA 在两种状态之间快速变化，在每次暴发中，每个分子尝试了两种不同的构象，得到了以两种构象 FRET 值的平均值为中心的 FRET 宽峰；D. 对于转变时间与扩散时间相似的 DNA 发卡，可以看到两个分离的峰，但是中间值也能看到。

**漂白和闪烁**

由于光物理和光化学反应，荧光团可以处于永远（漂白）或暂时（闪烁）不发射的状态（Kong et al. 2007）。图 5-6 显示了一个模拟的自由扩散的 ALEX 柱状图，双标分子的 $E=0.5$。受体随机的漂白或闪烁（图 5-6，左和中），大约每 300 个吸收发射循环发生一次。当 APBS 用来分析受体漂白或暂时处于暗状态的暴发，我们会发现受体光子减少而供体光子增加。这导致 $E$ 平均值减小而 $S$ 平均值增加。确切的值取决于时间和相对于暴发漂白和闪烁的时间尺度。由于漂白和闪烁是随机过程，它们会通过聚焦点在扩散过程中随机发生，导致 2D 的 *E-S* 柱状图中尾巴事件的发生（图 5-7A、B），把 *D-A* 亚群（$E=0.5$，$S=0.5$）和只有供体的亚群（$E=0$ 且 $S=1$）连接起来。当使用了 DCBS（下行），大多由闪烁和漂白引起的事件被移除了，留下 *D-A* 亚群。

**扩散的随机同时发生**

正如前面讨论的，为达到单分子分辨率，样品浓度要小于 100 pmol/L。这可以保证焦点上两个扩散分子同时出现的可能性很低，因为随机的同时发生将会改变 $E$ 和 $S$ 的值。如果浓度大于 100 pmol/L（图 5-6，右侧；300 pmol/L），两个亚群之间会形成桥，改变分布的形状和中心；DCBS 可以减小这种效应。

**监测和激发体积不匹配**

供体和受体监测体积的不匹配会使 FRET 的柱状图变宽。监测体积之间的不匹配意味着检测到一个供体光子和检测到一个受体光子概率的比例依赖于发光体的位置。这可以归因于色彩的偏差或者检测器或针孔的没有校准。净结果是供体和受体的光子的比例（即 $E$ 和 $S$）依赖于分子处于焦点的位置，这导致测得的 $E$ 值的延伸（图 5-8）。

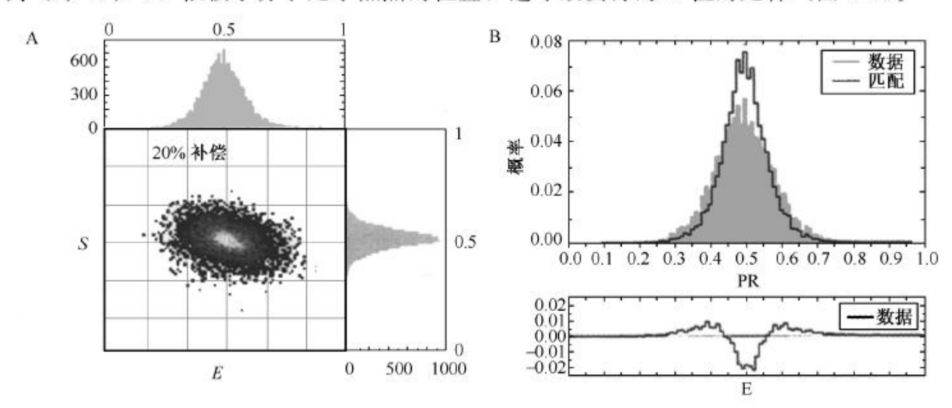



图 5-8　体积不匹配在 $E$ 柱状图的效应。A. 模拟受体检测体积相对于供体监测体积偏移了 20% 的 $E$-$S$ 柱状图，结果是发射噪声受限的 FRET 柱状图，这幅图与理论上的曲线匹配得不好（B，粗线）。

## μs-ALEX：测量准确的 FRET 效率

计算接近率的单分子 FRET 实验足以研究各种 FRET 状态和亚群的存在和相对量，还可以报告 FRET 不同状态之间的转变动态。但是，经常需要确定准确的 FRET 效率和荧光团之间相应的距离（如蛋白质转位或生物分子结构的确定）。在这些情况中，必须校准以去除光子的串扰和仪器偏差（Lee et al. 2005）；这样的校准因子适于所有 ALEX 方法。这里，我们描述 μs-ALEX 得到的准确 FRET 值的实验方案。

1. 只测量缓冲液的背景，对于红色和绿色激发，每个探测通道提取单独的背景强度。

2. 确定供体漏过参数 $l = f_{D_{ex}}^{A_{em}} / f_{D_{ex}}^{D_{em}}$（在受体通道中检测到的供体的相对发射）以及直接的受体激发因子（绿色激光的）$d = f_{D_{ex}}^{A_{em}} / f_{A_{ex}}^{A_{em}}$。因为荧光团光谱的性质依赖于环境，校正系数要通过使用单标记的载体在同等条件下得到（激发功率、缓冲液等）。

3. 确定检测-校正系数 $\gamma$（它解释了检测效率的不同以及对特定荧光团量子产率的区别）。

来自 2c-ALEX (532 nm/635 nm) 实验的荧光发射参数对于供体激发为 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$，对于受体激发为 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 和 $f_{A_{ex}}^{D_{em}}$；对于背景，所有值都要校正。我们首先计算未校正的接近比率 $E_{PR}^{raw}$ 和化学计量比 $S^{raw}$：

$$E_{PR}^{raw} = \frac{f_{D_{ex}}^{A_{em}}}{f_{D_{ex}}^{A_{em}} + f_{D_{ex}}^{D_{em}}}$$

$$S^{raw} = \frac{f_{D_{ex}}}{f_{D_{ex}} + f_{A_{ex}}} = \frac{f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f_{D_{ex}}^{A_{em}}}{f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f_{D_{ex}}^{A_{em}} + f_{A_{ex}}^{A_{em}}}$$

下面，我们校正直接激发 $d$ 和供体漏过 $l$，使用

$f^{FRET} = f_{D_{ex}}^{A_{em}} - 1 \times f_{D_{ex}}^{D_{em}} - d \times f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 替代 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$，我们获得

$$E_{PR} = \frac{f^{FRET}}{f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f^{FRET}}$$

$$S = \frac{f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f^{FRET}}{f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f^{FRET} + f_{A_{ex}}^{A_{em}}}$$

如果已知 $\gamma$ 就可以得到实际 FRET 值：

$$E = \frac{f^{FRET}}{\gamma f_{D_{ex}}^{D_{em}} + f^{FRET}} = \frac{E_{PR}}{[\gamma - (\gamma - 1) E_{PR}]}$$

$$\gamma = \frac{\phi_A \eta_{A_{em}}^{A}}{\phi_D \eta_{D_{em}}^{D}}$$

式中，$\Phi_D$ 和 $\Phi_A$ 为受体和供体的量子产量；$\eta_{A_{em}}^{A}$ 和 $\eta_{D_{em}}^{D}$ 为受体和供体发射通道的检测效率。

对于一对给定的荧光团，校正因子 $\gamma$ 也可以通过实验确定 (Lee et al. 2005)。简单地说，受体与供体之间量子产生的差别，以及供体与受体检测通道检测效率的差异将导致不同 Fret 效率下 $D$-$A$ 样品不同的 $S$ 值。$D$-$A$ 样品的 ($E$，$S$) 值确定了一个线性关系，从而可以测量 $\gamma$ 因子，根据下式：

$$1/S = 1 + \gamma\beta + \beta(1 - \gamma) E_{PR} = \Omega + \sum E_{PR}$$

$$\beta = \Omega + \sum - 1, \quad \gamma = (\Omega - 1) / \left[ \Omega + \sum - 1 \right]$$

式中，$\Omega$ 和 $\sum$ 分别为线性关系的交点和斜率，而且可以直接从 $E$-$S$ 柱状图得到。

根据 Förster 理论 (Förster 1948)，精确的 Fret 效率 $E$ 与荧光团之间的距离相关，如下式：

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

式中，$R_0$ 代表所用荧光对的 Förster 半径

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A \lambda^4 \, d\lambda$$

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2$$

Förster 半径专门与受体和供体荧光团联系，而且可由实验值确定，包括供体的量子产

量 $Q_D$、供体荧光光谱 $F_D$、波长依赖的受体淬灭系数 $\varepsilon_A$、介质折射率 $n$ 和阿伏伽德罗常数 $N$。染料相对取向表示为 $\kappa^2$，它可以从供体和受体的偶极矩之间的相对连接线（$\theta_A$ 和 $\theta_D$）和之间的相对角度（$\theta_T$）得到。对于自由旋转的荧光团，$\kappa^2$ 接近于 2/3（Clegg 1992）。

## 毫秒级 ALEX（ms-ALEX）：在毫秒时间尺度监测构象的动态

应用微秒级 ALEX 监测单个扩散分子可以在溶液中鉴别出异质性（如如果 FRET 效率或荧光化学计量数不同的亚群出现）。然而，只有在系统处于平衡或是变化缓慢时[在分钟级的时间尺度（Kapanidis et al. 2005a)]，可以用这种方法研究。为了在非平衡状态下研究系统动态，需要扩展单分子的观察。这可以通过在一个视野内同时观察多个表面固定的分子来实现。

### ms-ALEX 的原理

为了观察单个不动的荧光分子时实现高信噪比，我们使用 TIR 显微镜，它结合了只激发表面一个薄层的消逝场和通过超敏感相机的宽场检测技术（Margeat et al. 2006)。单激光激发的 TIR（SL-TIR）已经成功应用到监测生物分子复合体的构象动态（He et al. 2002；Zhuang et al. 2000，2002)。但是，SL-TIR 显微镜有类似于那些用于观察扩散分子的显微镜的局限：出现只有供体的分子群，当 $R_{D-A}>1.5\ R_0$ 时，检测不到 $D$-$A$ 分子群，而且不能检测只有受体的分子群。此外，影响 FRET 的荧光团光物理会被误解为探针之间的距离变化（Heilemann et al. 2005)。为了克服这些局限，基于 TIR 的毫秒级 ALEX 成像方法进行了改进（Margeat et al. 2006)。毫秒级 ALEX 允许我们获得 FRET 效率 $E$ 和荧光团分子比 $S$ 的分布，类似于溶液中的微秒级 ALEX。此外，毫秒级 ALEX 产生 $E$ 和 $S$ 的单分子动力学轨迹。基于 $S$ 的比率，我们可以过滤这些轨迹从而保留只有供体和受体同时激活的时间点。这样，我们就可以得到过滤过的 $E$ 的亚群分布以及过滤过的单分子的 E 的动力学轨迹，因为组成和光物理的异质性，这两者都不复杂。

### 搭建 ms-ALEX 的设备

毫秒级 ALEX 是单分子 SL-TIR 显微镜的延伸，已在第 2 章中进行描述。图 5-9 显示了设备的示意图以及升级所需的其他部件。简单地讲，我们需要添加第二根激光（红色激光）来激发受体。然后，每个相机的图片用绿色或红色激光记录。每当新的图像记录在照相机上，一个 TTL 信号就送到 PC 卡上，这会立即激发调制器，从而切换到另一根激光。

为了精确控制两根激光的相对位置和重叠，我们需要在它们进入 AOTF 之前用至少两个镜子控制激光位置。对于红色激光，这包括两个反射镜，对于绿色激光，这包括反射镜和一个放在动力装置上的 DM（图 5-9)，这个也用来让两根激光重叠（通过反射绿色激光和传递红色激光）。实验方案 4 提供了更多细节。

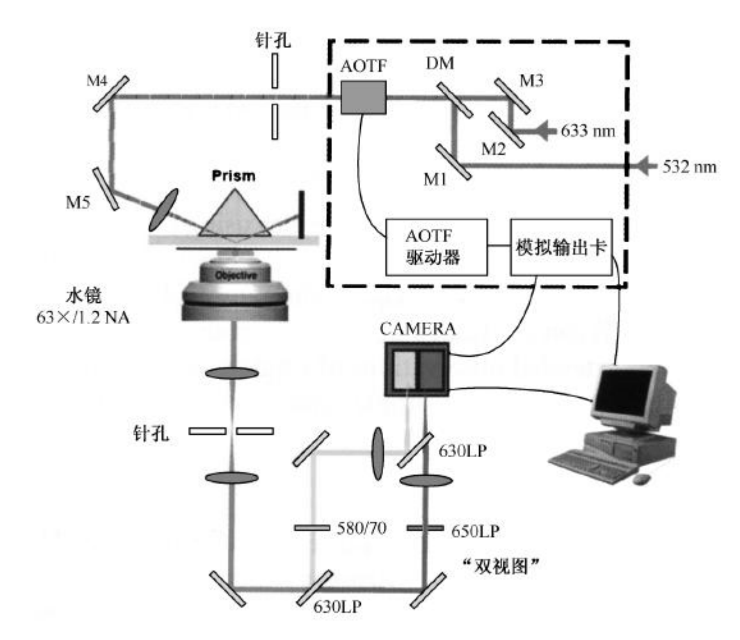



图 5-9 搭建 ms-ALEX 的设备。单激光全内反射显微镜改造以实现交互激光的激发和相机的同步化。虚线的长方形表示额外需要的设备：一根 633 nm HeNe 激光、三个镜子（M1～M3）、一个 DM、一个 AOTF 和一个控制器，以及模拟输出 PC 卡。

## 样品准备和数据获取

对于样品准备，我们使用类似 SL-TIR 的实验方案（见第 2 章）。简单地说，用氢氧化钾、丙酮、甲醇及去离子水清洗常规制备的石英片，然后在氮气中干燥。对于只操作核酸的实验，玻璃片要在干燥后马上使用，然后用生物素化的牛血清白蛋白（BSA）孵育。当实验中操作蛋白质时，片子要用聚乙二醇（PEG）共价修饰，在氨基-硅烷化之后，减少石英表面的非特异结合的蛋白质（He et al. 2002）。样品室用一个盖玻片和双面胶带作成，试剂通过石英片上钻出的孔流入。在观察之前，我们加入混合试剂以增加染料的光稳定性且减少闪烁。我们特意使用β-巯基乙醇、葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶（Yildiz et al. 2003），同时用 Cy5 或 Alexa647 这类羰花青染料作受体，或者当使用 Atto647 这类染料时要用 10 mmol/L 的巯基乙醇氨。

通过电耦合元件（CCD）照相机软件来获取数据（对于 Roper Scientifiz 公司的 Cascado 512B 型号 CCD，我们使用 Winview 软件）。在每张图像获取的末尾（帧转移），一个 TTL 脉冲在相似帧转移针孔部位被触发。其他 TIRF 上常用的相机，如 ANDOR 公司的 Ixont，也有相似的针孔。一个基于 LabVIEW 软件的程序用于检测 TTL 信号并激发一根激光迅速切换成另一根激光。用于 AOTF 控制器的模拟输出电压，对一根激光变为零的同时（激光关闭），对另一根激光变成预设定的电压（在 0～10V；电压越高，激光就越强）。在下一帧转移的时候则反过来。这个程序还可以通过传送 TTL 信号到 AOTPS 空白控制来切换所有的激光为开或关的状态。这个 LabVIEW 的程序是可

以免费申请到的（叫做“ms-ALEX control”）。

## 数据分析

对于数据分析，我们顺序使用两种独立的常规程序。第一种（Pa-Track；Visual C++写成）检测影片中的单分子并提取每个探测通道（供体和受体）和每个激发（红色和绿色）中每个单分子的强度轨迹。除了最后一个元件，这个软件类似于分析 SL-TIR 数据的软件。简单地讲，这个程序基于经验的相关系数把受体和供体通道的图像重叠起来。为了校正两个通道中图像的扭曲，还要使用几种计算方法来拉伸、旋转、放大或把一幅图转换成另一幅。为了定义这些参数，我们需在每次实验开始时给一个含有固定荧光珠子的样品（TransFluoSpheres；Invitrogen）成像。在激发时，珠子发射强而稳定的荧光，在受体和供体通道中都可检测到。这样，程序就可以轻松检测到珠子，还可以调节并记录供体和受体通道重叠所需的参数。

使用来自珠子的参数分析单分子荧光图像时，同样的转换也用于影片。在这一点，使用点识别计算来鉴别单分子点，这个方法考虑了点的强度、大小形状以及到邻近点的距离以排除来自旁边点的串扰。对于每种激光，背景校正通过减去每个点周围的平均强度来确定。之后，强度轨迹从整个图像序列中抽取并根据所用的激光分离，这样就产生了荧光发射的 4 个时间轨迹：供体激发的 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$，以及受体激发的 $f_{A_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$。

软件 Pa-Track 可以在两个不同通道中追踪二维中扩散的单分子轨迹，而且可以免费提供给有需要的实验室（P. Dosset et al. 未发表）。

第二个软件（轨迹分析；用 LabVIEW 写出）用不同的格式显示 $f_{ex}^{em}$ 的值。这个软件还可以计算 $E_{PR}^{raw}$ 比率（没有校正的 FRET 效率）、$S^{raw}$（没校正的荧光分子比）和 γ（检测校正系数）[见上文（μs-ALEX：测量精确的 FRET 效率）和 Lee 等（2005）与 Margeat 等（2006）]。系数 $l$ 和 $d$ 用来计算校正过的 $E_{PR}$ 和 $S$，γ 因子可以用来计算 FRET 效率 $E$。μs-FRET 中，$E_{PR}$ 和 $S$ 是对应每个分子计算的，与之相反，在 ms-ALEX 中 $E_{PR}$ 和 $S$ 是计算每个分子在所有时间点的值，而且用 $E_{PR}$-$S$ 柱状图表示。在这点，我们可以应用各种 $f_{ex}^{em}$ 阈值来去除只有供体或受体的时间点（图 5-10A，左侧，见图版，这里只显示同时具有供体和受体的点）。我们还计算了对于每个分子这些比率的均值（图 5-10A，右侧，见图版）。通过把 $E_{PR}$-$S$ 2D 的柱状图投影在 $E_{PR}$ 或 $S$ 轴上，我们可以建立一维的柱状图。

最后，我们为每个分子建立时间轨迹，呈现了作为时间函数的 $f_{ex}^{em}$、$E_{PR}$ 或 $S$（图 5-10B，绿色为 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$，红色为 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$，黑色为 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 的时间轨迹；见图版）。从这些轨迹中，很清楚地看到从受体闪烁发生的 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$ 之间的反相关行为(见 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 的时间轨迹)，而不是来自测量中 FRET 效率的改变。这样，通过用 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 作为阈值（大于 1000 个）过滤时间轨迹，我们可以产生 $E_{PR}$ 轨迹，而不包含“暗受体”的点（图 5-10C，见图版）。ms-ALEX 以光物理方式从单分子时间轨迹去除诱导的 FRET 改变的能力，对精确解释低的 $E_{PR}$ 值以及动态研究具有各种 FRET 状态的系统很重要，即使是包含了荧光团超越 FRET 发生距离的状态（$R_{D\text{-}A}>1.5R_0$）。用 ms-ALEX 得到的 $E_{PR}$ 轨迹，由于光物理、漂白或不完全标记所以不那么复杂，可以像 SL-TIR 那样分析（见第 2 章）。最后，从

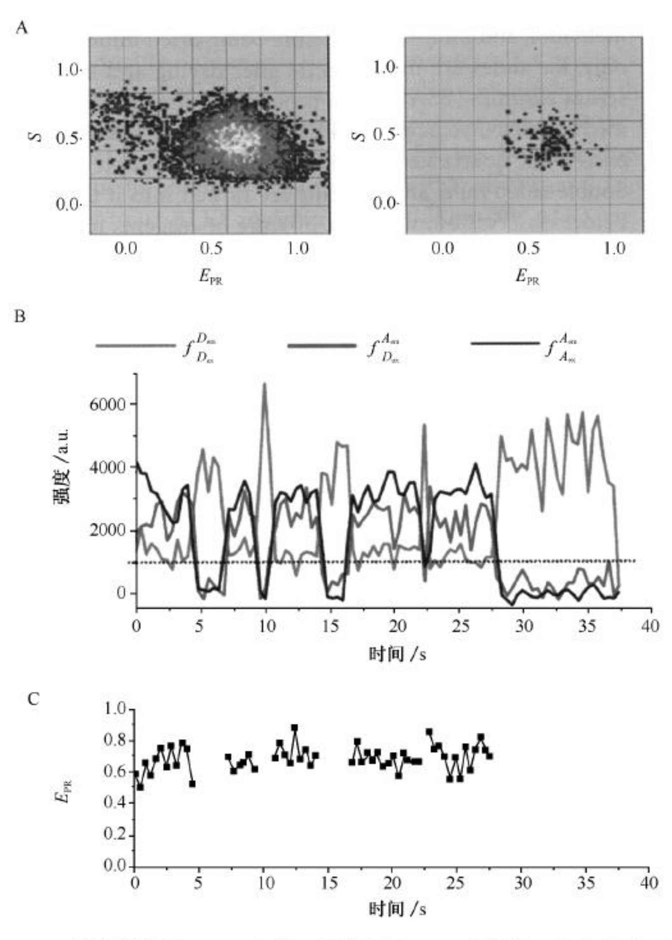



图 5-10　ms-ALEX 的数据分析。A.（左侧）所有分子 $E_{PR}$-$S$ 数据的二维柱状图，在所有时间点上。只有受体和供体荧光团都有活性的点才被选择。（右侧）对于每个分子，平均的 $E_{PR}$ 和 $S$ 都计算并显示了。B. 单分子 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$（绿色）、$f_{D_{ex}}^{A_{em}}$（红色）和 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$（黑色）的时间轨迹。$f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$ 的反相关行为来自受体的闪烁（见 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 时间轨迹）。C. B 图中一个分子的 $E_{PR}$ 轨迹，没有受体闪烁。

$f_{ex}^{em}$ 轨迹恢复所有用于计算 FRET 效率的校正因子的概率，把 ms-ALEX 变成了一个计算伴随构象变化的距离改变的独特工具。

## 纳秒级 ALEX（ns-ALEX）：用交替脉冲激光探测快速动态

微秒级的 ALEX 对于测量分子构象是一个方便且高通量的方法，但是它的局限是波动要比扩散时间慢。为了检测快速的构象动态，一种基于快速交替激光的方法的改变可以派上用场。两个脉冲激光可以在纳秒尺度上交替（达到皮秒的脉冲宽度）（Laurence et al. 2005；Muller et al. 2005），而不用毫秒尺度的交替 CW 激光。

## ns-ALEX 的原理

这种称作 ns-ALEX 的方法是用来自两个激光的交替脉冲来实现的（图 5-11）(Laurence et al. 2005)。一种近似的方法是脉冲交替激发（PIE；Muller et al. 2005)。这里，我们描述 ns-ALEX，但对于 PIE 实验不管用。光子流用双时间值来记录：大时间和小时间。大时间是实验开始到光子到达之间的时间。这种低分辨时间与微秒级 ALEX 相同，用来分析暴发。小时间是光子到达和下一个激光脉冲之间的时间。这个高分辨的时间（10～100 ps）测量不适用于其他的 ALEX 实验，但可以用于荧光寿命分析。实际上，得到时间寿命信息帮助，ns-ALEX 可探测快速的构象变化。当分子在亚微秒级经历构象变化时，在暴发中 FRET 效率的改变被平均化了，被测量的距离只表现为单个扩散分子之间的平均距离。但是，当时间周期柱状图来自 ns-ALEX 时，快速的构象变化可反映在柱状图上相关亚群多指数的供体衰减和受体上升。通过把某些分子时间周期曲线做拟合，我们可以得到构象的全部分布。这个分析提供了来自 μs-ALEX 的所有信息，以及关于构象分布的信息，受体供体的寿命，以及受体供体时间分辨的各向异性。

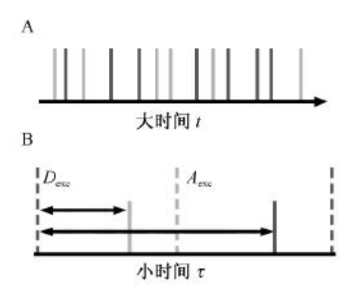



图 5-11 ns-ALEX 的时间简图。A. 相对实验起始（大时间），所有光子的到达时间；B. 每个光子相对激发时间（小时间）的到达时间。

在发射模块中，ns-ALEX 使用了 4 个探测器（而不是两个）在两个波长范围和两个偏振性上探测光子。这对准确测量距离很重要，因为每个荧光团旋转的自由度可以直接估计或用来得到取向因子 $\kappa^2$（见上，μs-ALEX：测量准确的 FRET 效率），可以更准确地把 $E$ 转变成 $R$。ns-ALEX 的另一个优势是它可以和荧光相关光谱（FCS）兼容，这是一种通过观察光子之间关系来研究分子扩散行为的成熟方法（见第 12 章）。通常，当两种颜色的 FCS（交叉关联）实施时，供体漏到受体通道造成了假的相关值（在受体通道检测到的漏过的供体光子与供体光子相关）。来自 ns-ALEX 实验的数据可以正确校正：漏过的供体光子被识别并消除，取决于鉴别激发源的大时间。来自供体泄漏的受体光子可以被认为是来自供体激发，尽管它们在受体通道被检测，而且被排除在分析之外。

## 搭建 ns-ALEX 装置：主要的考虑点

为了实施 ns-ALEX，我们需要两根脉冲的并协同的激光。它们的重复速率需要调节以便每一对脉冲可以被分离从而允许被激发的荧光团被充分释放。适于单分子荧光实验的短的脉冲激光相对昂贵。对大时间或小时间记录板的需求（时间相关的单光子计数装备，或 TCSPC；来自 Becker-Hickl 或 PicoQuant)、一个增加的检测器数量，以及偏振光学设备增加了额外的花费。最后，把光子流转换为时间寿命数据和符合计算的时间需要复杂的程序，这对很多实验室可能会是个挑战。这样，ns-ALEX 对于想做的实验是一种通用的但昂贵复杂的工具。

**激发模块**

交替脉冲激光　　我们应用 ns-ALEX 与脉冲激光对：绿/红和蓝/红（图 5-12）。在第一种情况中，一个来自 HighQ（IC-532-1000 ps Nd：VAN，HighQ Laser Production GmbH）的脉冲绿色固体激光（532 nm，68 MHz 的重复频率）与红色的二极管激光（635 nm，LDH 635-B，PicoQuant GmbH，Berlin）合并。由于绿色激光在固定频率操作，红色激光要受绿色激光控制。这种配置具有 68 MHz 的固定频率，或者在两次连续脉冲之间有 14.7 ns 的间隔（同样颜色的激光）。在第二种情况中，一个脉冲的蓝色二极管激光（467 nm，LDH-P-C-470，PicoQuant GmbH，Berlin）与脉冲的红色二极管激光结合（与上文相同）。在这种情况中，重复速率可以在 5～40 MHz 变动。这个宽的频率范围保证了更长荧光周期的荧光团的 ns-ALEX 的检测，提供了连续脉冲之间达到 200 ns 的窗口。在两种应用中，供体激发的激光（绿或蓝）激发了受体激发的激光。激发信号（一个激光的 TTL 输出）被送到时间板以使 TCSPC 板同步化。

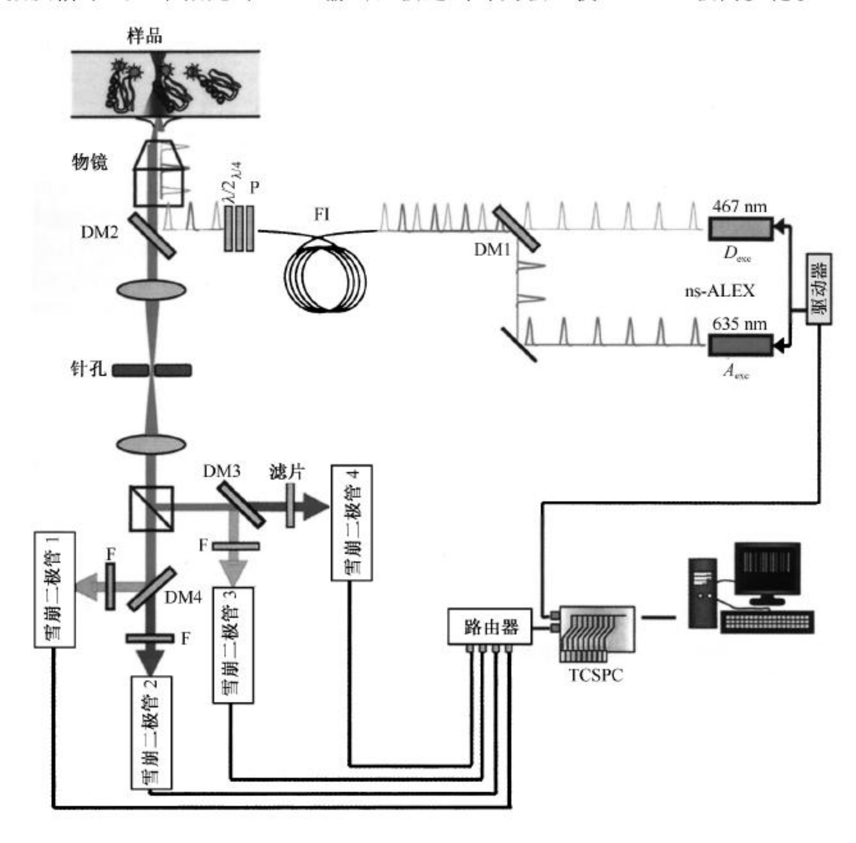



图 5-12　蓝-红 ns-ALEX 的结构简图。

主控激光的 SYNC 信号可能太弱而不能由 SPC 卡处理。如果是这种情况，信号可以用标准的商业放大器放大（如 Miteq 公司的 AM-3A-000110）。通过使用 TCSPC 卡，SYNC 信号需要被反转，更多细节见生产商手册。

重复速率的选择　　每个重复周期都应该足够长，以便在供体激发后让供体和受体充分释放（如给光诱导的激发状态足够的时间以便在下一个激发循环之前回到基态），并在受体激发后充分释放受体。例如，当使用 407 nm/635 nm 激发时，供体和受体的寿命分别是 3.5 s 和 1.5 s。我们选择 25 ns（40 MHz）作为两个激光的重复周期，而且我们在两个激光之间间隔 12 ns。脉冲频率的混合和延迟保证了两个荧光团有足够的时间释放并消除衰减之间的重叠。

激发强度的选择　　用于荧光激发的平均能量通常都是由荧光产生的量子决定的，不同能量大小之比可调控，以使得 $S\approx0.5$。尽管与在 μs-ALEX 实验中所用的平均能量几乎相同，一些皮秒级的脉冲却拥有很高的瞬时能量，这些极高的瞬时能量会引起显著的漂白效果。因此对给定的样本进行实验时，建议在整体测量水平上对激光强度进行校正和优化。

偏振光的调控　　光子的 ns-ALEX 分析需要有关偏振激发的相关知识。激发通路中的一束偏振光控制激发光沿着激发光束的通路按照直线形偏振、1/4 波片、1/2 波片的顺序递变。利用这种调控方式可以很容易对二色性激发引起的偏振相差进行校正，同时也能够在共焦点处获得纯净的直线形或者环形偏振光束。

**检测模块**

纳秒级的 ALEX 实验用 4 个 APD 按照发射光波长和偏振性来区分光子，而 μs-ALEX 只用两个。光子流在路由器（HRT-82，Becker-Hickl）中混合，同时被 TCSPC 卡（SPC-630，Becker-Hickl）所记录。该系统还要用到可以实时监测光子流的计数板，这种元件板是设备校正所必不可少的（PCI-6602，见前文，微秒级 ALEX：构成、校准及设备验证中激发模块部分）。其他的 TCSPC 板也可以使用，如来自 PicoQuant 公司的 PicoHarp，拥有每个通道 4 ps 的高速同步分辨率和可测量单个目标到达时间的清晰度。

**MicroTime 200：一个完全商品化的系统**

MicroTime 200 是一种功能强大的商用荧光寿命显微镜（PicoQuant），可以在单分子敏感度下捕捉全荧光寿命图像。这种设备混合了两种同步脉冲激光，易于操作，不需要太多调试，同时可以用商业软件对数据进行分析。美中不足的是价格较高。

## ns-ALEX：数据的获取和分析

**荧光寿命分析**

如果给出一对独立的能量供体和受体的距离，那么 FRET 的效率可以表示为

$$E=\frac{k_{FRET}}{k_D+k_{FRET}}$$

式中，$k_D$ 为在没有荧光受体的情况下供体能量的发射比率；$k_{FRET}$ 为转移的能量比率。这些比率与受体存在或不存在时供体荧光的寿命（$\tau_{AD}$ 和 $\tau_D$）有关，其关系式如下：

$$\tau_D=1/k_D$$

$$\tau_{DA}=1/(k_D+k_{FRET})$$

观察到的供体荧光强度的衰减函数为

$$I(t)=I(0)\mathrm{e}^{-t}/\tau_{DA}$$

FRET 的效率 $E$ 的连续分布函数为

$$\langle E \rangle = \int p(E) E \mathrm{d}E$$

式中，$p(E)$ 为某一分子 FRET 效率为 $E$ 的可能性大小，从而供体荧光衰减强度可以表示为

$$I(t) = I(0)\int p(k_{\mathrm{FRET}})\mathrm{e}^{-k_{\mathrm{FRET}}\cdot t}\mathrm{d}k_{\mathrm{FRET}}$$

对在纳秒级 ALEX 实验中得到的配套的荧光供体和受体的能量衰减应用这个分布函数，可以解出 $p(k_{\mathrm{FRET}})$，即 $p(E)$。由前面的章节我们知道：

$$E = \frac{1}{1+(R/R_0)^6}$$

因此，我们可以得出 $P(R)$，并求出所有距离上的 FRET 效率分布。

**数据的还原和分析**

单分子数据用暴发分析法来分析（见上文，数据分析）。在构建 $E$-$S$ 柱状图和分选亚群之后，就可以产生荧光强度的衰减。总的来说，可以产生所有亚群的受体和供体衰减的柱状图（图 5-13，见图版），每幅图都提供了每个分子和每个荧光团的有用信息。考虑到几种分布，如背景、仪器响应函数，以及荧光团的旋转（时间分辨率的各项异性），这些衰减完全适合于一定距离分布的模型。最小二乘法用于通用拟合（Bevington 1969），而且距离分布的模型可以是高斯分布、多重高斯分布或更复杂的模型［如 worm-like-chain 模型，如图 5-14，或倾斜高斯（Ratner et al. 2000）］，根据所研究的分子来选择（Laurence et al. 2005）。

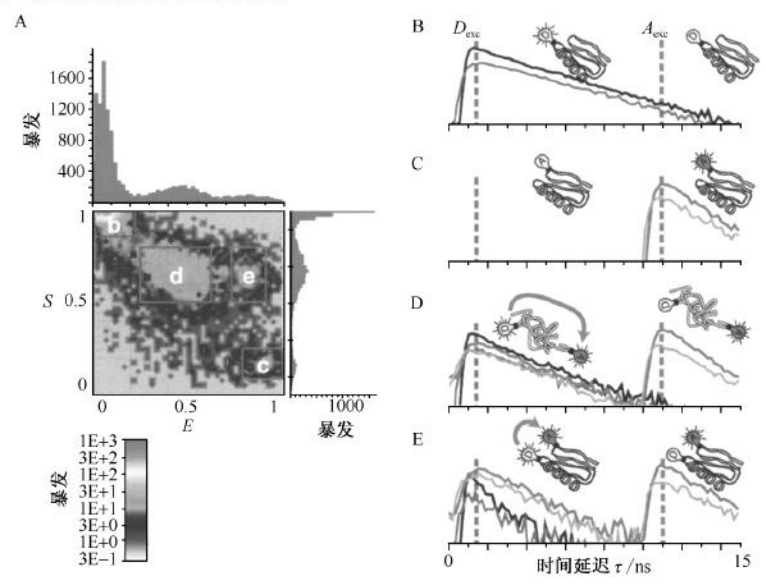



图 5-13 $E$-$S$ 柱状图和不同亚群 ns-AlEX 荧光强度衰减。黑色和绿色的衰减代表供体发射，分别平行和垂直于激发的偏振。红色和橙色衰减代表受体发射，分别平行和垂直于激发的偏振。A. ns-ALEX 得到的 $E$-$S$ 柱状图。B～E. 来自只有供体的荧光强度衰减（B），只有受体（C），低 FRET 的供体受体复合物（D），FRET 高的供体受体复合物（E）。

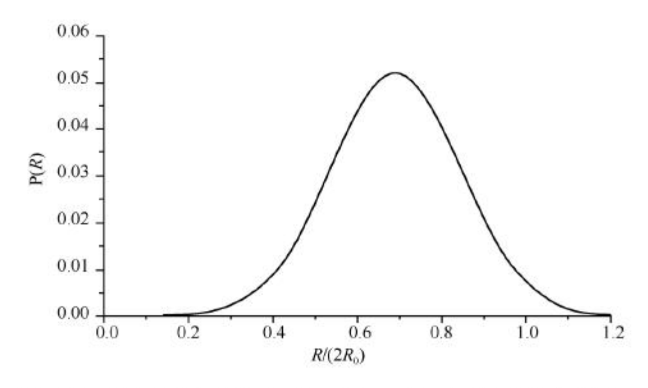



图 5-14　单链 DNA 样品（dT）$_{50}$在 1 mol/L NaCl 中的距离分布，用 worm-like-chain 模型拟合。

## 实验方案

下面的实验方案描述了安装和调试 μs-ALEX 设备以及 ms-ALEX 设备的建立（设备细节详见表 5-2）。

**表 5-2　构建 ALEX 显微镜模块所用部件的供应商**

| 元件 | 类型 | 供应商 |
|---|---|---|
| **激发模块** | | |
| 激光 | 氩离子 | Melles Griot，Newport |
| | Nd：YAG | Cobolt，Laser2000 |
| | 二极管激光 | Coherent，Picoquant |
| | 氦氖 | Melles Griot |
| 调制 | EOM | Conoptics，Linos |
| | AOM | Isomet |
| | AOTF | AA-Optoelectronics |
| 光学 | 滤片、二色镜 | Semrock，Omega，Chroma |
| | 镜头、镜子 | Linos，Thorlabs |
| | 偏振器、1/4λ、1/2λ | Newport |
| | 棱镜 | Melles Griot |
| 光纤 | 光纤 | Thorlabs |
| | 光纤耦合器 | Thorlabs，Newport |
| | 复用器 | AA-Optoelectronics，Linos |
| 光机 | 杆子、架子、动力装置 | Thorlabs，Comar，Linos |
| | 平移台子 | Linos，Newport，New Focus，Thorlabs |
| **载物模块** | | |
| 显微镜 | IX71 倒置显微镜 | Olympus |
| | Axiovert 100，200，200M | Zeiss |
| | Leica 二色镜 IL | Leica |
| 物镜 | PLAPON 60 倍 TIRFM 油镜，数值孔径为 1.45 | Olympus |
| | UPLSAPO 60 倍水镜/1.2 W | Olympus |
| | Alpha Plan-Fluar 100 倍，数值孔径为 1.45 的油镜 | Zeiss |

续表

| 元件 | 类型 | 供应商 |
| --- | --- | --- |
| 温度控制 | 物镜加热套 | Biosciencetools |
| | 物镜冷却套 | Intracel |
| | 显微镜温度控制 | Olympus，Zeiss，Leica |
| 发射模块检测器 | 雪崩光电二极管 | PerkinElmer（SPCM-AQR-14 或 15），Picoquant（PDM 20/50/100CT） |
| | EMCCD 相机 | Roper Scientific，Andor |
| 光机 | 检测器的平移台 | New Focus |
| | 运动的架子、滤色片架子、杆子、基座、针孔的平移装置 | Thorlabs，Comar |
| 光学 | 滤色片、二色镜 | Omega，Chroma，Semrock |
| | 镜头、针孔 | Linos，Comar |

以上为作者实验室的供应商；很多其他的供应商也可以的，尤其对于激发模块。

## 实验方案 1：μs-ALEX 装置的搭建

本实验方案描述了如何应用两根激光来构建 μs-ALEX，两根激光是 532 nm 的声光调制激光和 635 nm 的直接调制激光。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

设备

雪崩光电二极管（APD）
BNC（Bayonet Neil Concelman）电缆
台式计算机
二色镜（DM）
发射光分光器（650DRLP）
光纤耦合器
激光（绿色 532 nm 声光调制的和红色 635 nm 直接调制）< !>
有合适物镜的显微镜
镜子
调制器
光纤（单模）
光学台
白纸
偏振器（λ/4，λ/2）
载玻片（玻璃）（可选；见步骤 5）
光谱滤色片（绿色通道用 585DF70，红色通道用 650LP）

### 方法

1. 把激光、调制器和光纤耦合器安置在一个 50 cm 见方的光学台上。确认激光的偏振有水平和垂直的。如果达不到，就用偏振器来使偏振直线化，并通过调节激光位置或用 λ/4 与 λ/2 板的组合来把光转到垂直方向。用两个镜子把绿色激光导入 AOM 的孔。
2. 让两束激光重合，绿色激光用一个镜子（图 5-3 中的 M1）和一个二色镜（DM1，560DRLP），红色激光用两面镜子（M2、M3），这样把混合的激光束耦合导入光纤。
   警告：大多数情况下，用于 ALEX 的激光属于 IIIB 级别（这是国际激光安全标准 IEC60825 的基础）。按照激光的安全说明操作很重要，说明中有安全总则和特殊的仪器规则。应该在 ALEX 设备安装前联系激光的安全负责人做风险评估和安全指导。
3. 把光纤的出口放置到显微镜的面板上，后面接 10～20 倍的校正物镜，放在 $x$，$y$，$z$

方位台上。

校准物镜的选择依赖于聚焦物镜的后孔径的直径，物镜应该全部照明。用普通的单模光纤和10倍的校正物镜，光束直径可以达到5～10 mm。

对于一些应用，有时需要不填满后孔径以增加聚焦点的体积。这反过来增加了分子扩散时间和单个扩散分子释放的光子。

4. 把激光光束指向显微镜侧孔。光束应该放在聚焦物镜后孔径的中心，同时在视野中。使用 $x$，$y$，$z$ 方向的定位台来调节光束位置并校正光束。
5. 通过反射散射的激发光线来调节检测通路（放置一个玻璃片并且聚焦到玻璃片的上面，或者在物镜上放一个镜子）。光线将通过激发二色镜并可以用一小张白纸沿着检测通路观察到。把针孔放在镜头的前焦点，放到一个 $x$，$y$ 或 $x$，$y$，$z$ 方向的方位台上，后面跟随第二个镜头来校正光线。用两个检测器上的发射光分光器将平行光分开，后面跟合适的光谱滤色镜。用一个 20 mm 的镜头将光线聚焦到 APD 的活性区域，APD 放在微米精度的方位台上。
6. 把每个检测器都安放在方位台上并用 BNC 电缆连接到计算机的计数板上。

# 实验方案 2：校正 μs-ALEX

为了达到单分子敏感度从而检测到扩散的荧光团，仔细校正系统很重要。本实验方案描述了用光谱窗 $G^{550\text{-}620}R^{650\text{-}750}$对 2c-ALEX（532 nm/635 nm）的常规校正。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

校正样品［如四甲基罗丹明（TMR；Invitrogen）或 Cy3B（Amersham Biosciences)］

设备

雪崩光电二极管（APD）
相机和 CCTV 监测器（可选；见步骤 3）
玻璃片
激光< !>
光密度（OD）滤片（可选；见步骤 3）
有合适元件的显微镜

## 方法

1. 制备校正用样本（浓度约 $10^{-9}$ mol/L)，是可以被 532 nm 激发的荧光团并从红色通道表现出相当大的串扰（这样两个检测器都可以检测）。四甲基罗丹明或 Cy3B 都可以。
2. 把绿色激光功率设定在 50 μW（进入显微镜之前测量）。
   校正之后（如步骤 7 之后)，这个激光强度应该产生一个相当大的信号，50～100 kHz。如果信号弱（如因为设备没有调试好)，增加激光功率直至达到需要的光子速率。
3. 加 50 μl 的校对样品到玻璃片上。用目镜找到水和玻璃的界面，再抬升物镜，移动光束 20 μm 到溶液中。
   警告：激光辐射对眼睛有危害。当使用目镜且激光功率高于 100 μW 时，我们要在光束进入显微镜前减弱它（如用一个 OD 滤色片)。或者，在相机接口接一个相机，用 CCTV 监测器聚焦。
4. 调节显微镜的操纵杆，把光导向监测器。
   警告：APD 可以被过量的光破坏（如样品浓度的错误或缺少滤色片)。如果观察到高速率的光子（通常几兆赫兹；见制造商的手册)，马上阻止光进入 APD。
5. 对于第一次校正，要把针孔拿走。然后，用 $x$，$y$ 方向的螺旋测微器调节检测器。

如果放置在 APD 之前的镜头位置准确而且光束是校正好的，APD 检测到的反应将会出现一个平台（因为与 APD 的活性相比焦点的尺寸很小）。

6. 插入针孔并用 $x$，$y$ 方向方位台调节它的位置。理想状况下，第一次调节时，针孔尺寸从大一点（200 μm）开始，然后到 100 μm，再到 50 μm。确保当再次调节针孔位置时，两个检测器相关的信号都能观察到，从而确认最佳位置。
7. 用步骤 5 中的方法再次调节检测器。

对于一个特定的设备，在调节程序之后很容易做一系列观察［如一个标准浓度的校准样本（$10^{-9}$ mol/L 的荧光团）的光子速率和确定的激发功率（50 μW）］。两种检测通道的发射强度比和发射速率是重要的数值。

# 实验方案3：μs-ALEX样品的准备和数据的获取

本实验方案描述了μs-ALEX样品的准备和数据的获取过程。样品准备需要稀释，这样可以保证单个事件的检测。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

牛血清（BSA）
样品缓冲液的成分（专用于发光物质的检测，购自Fluka，Merk，Fisher）
KOH（1 mol/L）<!>
待检测的样品

### 仪器

玻片
滤器（0.2 μm）
密闭培养皿
激光<!>
能够读取实验数据的各种显微镜组件

## 方法

1. 玻片在用之前用1 mol/L的KOH和$H_2O$冲洗。
2. 准备缓冲液并用0.2 μm滤器过滤。为了测定纯度，用测定样品的标准对缓冲液进行测定（见排疑解难）。
3. 为了避免生化分子对吸光度的影响（如大分子蛋白质会黏附在玻片上），在缓冲液中应加入BSA（10～50 μg/ml）。或者用含BAS的缓冲液对玻片表面进行处理（蛋白质会在玻片表面形成一层），或者测定时用含BSA的缓冲液。
4. 将样品稀释到100 pmol/L。
   通常confocal的容积是1 fl左右，100 pmol/L的浓度使单分子检测的可能性为0.1。
5. 用密闭的塑料盒或密闭的培养皿可进行测定。这样可避免数据读取过程中的挥发和样品浓度的升高。
6. 用合适的配置和分析方法获取数据（见排疑解难）。

## 排疑解难

**问题**：缓冲液中的杂质。

［步骤 2］

**解决方法**：用于单分子检测的缓冲液应不含有荧光杂质。荧光杂质的含量主要取决于制备缓冲液的化学物质的质量。许多化学物质只有在高纯度下才有效，应该被用来配制测定用的缓冲液。缓冲液的纯度可以根据观察到的脉冲数来估计，理论上说缓冲液的脉冲数和脉冲强度应该比样品的都低。总之，杂质易出现在绿色通道（因为杂质激发红色光较少），因此可以通过数据分析过滤掉。在实际的实验中，杂质的荧光计量速度应该（比普通的少 1/3 以上）比荧光团低得多，而脉冲频率（与杂质含量成正比）应该比 100 pmol/L 的带标记的分子低 10%以上。

**问题**：光子数不够。

［步骤 6］

**解决方法**：有机荧光团的总光子量产出是有限的（在漂白之前可产生约 $10^6$ 光子）。根据荧光团的类别不同，缓冲液中氧的去除（Yildiz et al. 2003）和三重态淬灭剂的添加（Rasnik et al. 2006）可明显增加光子的产量。

**问题**：分组方案不够充足。

［步骤 6］

**解决方法**：激发能量的比率会影响化学计量的比率 $S$（见前文，基本概念和 ALEX 的考虑）。改变比率会影响二维柱状图 $E$-$S$ 的分组情况，从而影响分组方案。

**问题**：光漂白的发生。

［步骤 6］

**解决方法**：高激发能使荧光团易发生光漂白（激发源和被激发物质都易发生）。在 FRET 实验中，物质接受 650 nm 激光的激发更容易漂白。在某些情况下，光漂白可以通过将 50%～50%的绿红光比改为 80%～20%的绿红光比得到改善（Kong et al. 2007）。

**问题**：没有足够的统计学方法解决现有的问题。

［步骤 6］

**解决方法**：μs-ALEX 检测单个物质并且可以生成具有统计学意义的数据。任何仪器都应该提供充分的数据来解决问题。测量时间为 2～30 min。快速测量可对样品的总体有一种初步了解，并且可根据快速测量决定是否要对样品进行长时间跟踪测量。样品的密闭、可靠的温度控制、合适的激发能的运用（如提供合适的光子计数条件并且控制明显的光漂白）、物理性质和光学性质稳定的配备是保证长时间测定和数据获取的必要条件。

**问题**：有时得到不准确的数据。

［步骤 6］

**解决方法**：记录实验中额外的变量已备数据分析用。用红绿激发光分别测定两种激发光的周期之间的缓冲液的背景。同时，测定供体的漏过（供体荧光在受体通道的相对发射）和在同样条件下单个标记的受体的直接发射。

**问题**：$E$ 值和得到的距离不准确。

［步骤 6］

**解决方法**：如果实验目标是决定准确的 $E$ 值（和相应的距离），就需确定所用荧光团的校正系数 $\gamma$（见上文，μs-ALEX：测量准确的 FRET 效率）。

# 实验方案 4：建立 ms-ALEX 设备

ms-ALEX 设备是单分子 SL-TIR 的延伸。本实验方案描述了建立 ms-ALEX 设备的过程，包括激光调节和连接以及 AOTF 和相机的程序设置。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 设备

除了单分子 SL-TIR 所需设备（见第 2 章），还需要以下物件：
平行输出卡（National Instruments）
AOTF（声光可调滤波器，AA-Optoelectronics）
连接器 SCB-68（National Instruments）
DB-25 电缆（任何电子商店）
DB-26 电缆（相机供应商）
二色镜（Omega filter）
电动的二色镜架子（Thorlabs）
激光（红和绿，包括 HeNe 633 nm 17 mW；Melles Griot）＜!＞
多通道驱动和远程控制（AA-Optoelectronics）
中性密度滤片
NI 电缆（National Instruments）
软件：LabVIEW（National Instruments）
可视的定量镜子和架子（3 套，Thorlabs）

## 方法

### 激光器调节

1. 安装 SL-TIR 设备所有元件（见第 2 章）。在光学台上，在绿色激光和 M4 镜子之间留出足够空间（50 cm×30 cm），来调节 AOTF 和需要的光学元件。
   警告：大多数情况下，用于 ALEX 的激光属于 IIIB 级别（这是国际激光安全标准 IEC60825 的基础）。按照激光的安全说明操作很重要，说明中有安全总则和特殊的仪器规则。应该在 ALEX 设备安装前联系激光的安全负责人做风险评估和安全指导。
2. 打开绿色激光。为了安全，在激光前放一个中性滤片。在 M4 前放置一个光圈，放置在绿色激光束中心。把这个作为校准的一个标志。
3. 把绿色激光横向移动 15～20 cm。把镜子 M1 和 DM 引入光路，并重新调节绿色激光。用 M1 重复调节孔中的激光，用 DM 调节棱镜或物镜上的激光。
4. 把红色激光安放在绿色激光旁边。安装 M2 和 M3。打开红色激光并在前面放置中性滤片以保证安全。再用 M2 把红色和绿色激光重合到 DM 上，使用 M3 调整红色激

光进入孔径。红色激光应该在整个光路中基本与绿色激光重合。

5. 把 AOTF 放在孔径之前。AOTF 的进入窗必须与入射光线垂直。为了实现这个目的，先转 AOTF 直到窗口上的反射光与入射光重合。两束激光应该以一定角度离开 AOTF 并被孔径挡住。在继续调节之前，安装 AOTF（见步骤 10～步骤 14）。
6. 用 AOTF 的控制软件打开红色激光。红色激光应该是偏斜的并且在接近中心的位置撞到孔。侧向移动孔径使红色激光通过孔径。
7. 用 M4 和 M5 调节红色激光相对物镜和棱镜的位置（就像 SL-TIR 一样）。通过观察目镜，红色的 TIR 光点应该在视野中心。
8. 用 AOTF 打开绿色激光。绿色激光要基本与红色的重合。如果需要，用 M1 把绿色激光放到孔径中心，用 DM 把 TIR 光点放到视野中央，并与红色光点重合。
9. 一般来说，绿色的 TIR 光点比红色的要大，绿色 DPPS 激光光束的偏差比红色氦氖激光的要大（2 mrad 对 0.8 mrad 偏差，由制造商规定）。为了更好地重合，放置一个焦距 1～2 mm 的镜头在绿色激光出口，确保在当绿色激光撞到棱镜前绿色镜头时，减少绿色光束的直径。

## 连接并对 AOTF 和相机编程

AOTF 需要固定在光学台上，激光光束要进入与之垂直的入口（见步骤 5）。

10. 把 AOTF 连接到动力上，按供应商推荐的操作（频率和温度控制电缆）。
11. 在 DB-25 缆线的末端切断 DB-25 连接器。用万用表鉴定线路连接到 AOTF 背面 9～16 号针（见下面的简图）。在 SCB-68 板上把这些线路连接到相应的针上，如图所示。把 DB-25 连接器插入 AOTF 的传动器里。

| | 声光可调滤波器 | 1 13 14 25 |
|---|---|---|
| SCB 68 PIN | 标号 | 针孔 # |
| #25（DAC3OUT） | Line 4 | 9 |
| #57（DAC2OUT） | Line 3 | 10 |
| #21（DAC1OUT） | Line 2 | 11 |
| #22（DAC0OUT） | Line 1 | 12 |
| #52（DIO0） | 空白 | 13 |
| #27（AOGND） | 基线 | 14,15,16 |

12. 在 DB-26 缆线的末端切断 DB-26 连接器。用万用表确定线路连到相机后的 3 号和 7 号针（见下面的简图）。连接这些线路到 SCB-68 板上相应的针，如说明书。把 DB-26 连接器插到相机中。

| | 相机 | 9 1 26 19 |
|---|---|---|
| #50（DGD） | 基线 | 3 |
| #17（DIO1） | 帧读出 | 7 |

简图代表 Roper Scientific Cascade 相机。细节参考专门的相机说明书。

13. 在计算机中安装 NI PCI 6733 并连接到 SCB-68 板上。

14. 使用供应商的说明，根据激光安装 AOTF 的动力器。把 532 nm 激光放在 AOTF 第一线，633 nm 激光在第二线。

警告：把所有的激发光路光学元件（激光出口到镜头 M5 之间的元件；图 5-9）放到一个黑色盒子里。这将保护设备免于灰尘并增加使用者的安全。

## 参考文献


Bevington P.R. 1969. *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. McGraw-Hill, New York.

Clegg R.M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* **211:** 353–388.

Deniz A.A., Dahan M., Grunwell J.R., Ha T., Faulhaber A.E., Chemla D.S., Weiss S., and Schultz P.G. 1999. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 3670–3675.

Eggeling C., Berger S., Brand L., Fries J.R., Schaffer J., Volkmer A., and Seidel C.A. 2001. Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *J. Biotechnol.* **86:** 163–180.

Förster T. 1948. Intramolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Physik* **2:** 55-75.

Ha T. 2001. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25:** 78–86.

———. 2004. Structural dynamics and processing of nucleic acids revealed by single-molecule spectroscopy. *Biochemistry* **43:** 4055–4063.

Ha T., Enderle T., Ogletree D.F., Chemla D.S., Selvin P.R., and Weiss S. 1996. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 6264–6268.

Ha T., Rasnik I., Cheng W., Babcock H.P., Gauss G.H., Lohman T.M., and Chu S. 2002. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature* **419:** 638–641.

Heilemann M., Margeat E., Kasper R., Sauer M., and Tinnefeld P. 2005. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J. Am. Chem. Soc.* **127:** 3801–3806.

Jager M., Michalet X., and Weiss S. 2005. Protein-protein interactions as a tool for site-specific labeling of proteins. *Protein Sci.* **14:** 2059–2068.

Jager M., Nir E., and Weiss S. 2006. Site-specific labeling of proteins for single-molecule FRET by combining chemical and enzymatic modification. *Protein Sci.* **15:** 640–646.

Kapanidis A.N. and Weiss S. 2002. Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules. *J. Chem. Phys.* **117:** 10953–10964.

Kapanidis A.N., Laurence T.A., Lee N.K., Margeat E., Kong X., and Weiss S. 2005a. Alternating-laser excitation of single molecules. *Acc. Chem. Res.* **38:** 523–533.

Kapanidis A.N., Lee N.K., Laurence T.A., Doose S., Margeat E., and Weiss S. 2004. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 8936–8941.

Kapanidis A.N., Margeat E., Ho S.O., Kortkhonjia E., Weiss S., and Ebright R.H. 2006. Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism. *Science* **314:** 1144–1147.

Kapanidis A.N., Margeat E., Laurence T.A., Doose S., Ho S.O., Mukhopadhyay J., Kortkhonjia E., Mekler V., Ebright R.H., and Weiss S. 2005b. Retention of transcription initiation factor $\sigma^{70}$ in transcription elongation: Single-molecule analysis. *Mol. Cell* **20:** 347–356.

Kong X., Nir E., Hamadani K., and Weiss S. 2007. Photobleaching pathways in single molecule FRET experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **129:** 4643–4654.

Laurence T.A., Kong X.X., Jager M., and Weiss S. 2005. Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 17348–17353.

Lee N.K., Kapanidis A.N., Wang Y., Michalet X., Mukhopadhyay J., Ebright R.H., and Weiss S. 2005. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophys. J.* **88:** 2939–2953.

Margeat E., Kapanidis A.N., Tinnefeld P., Wang Y., Mukhopadhyay J., Ebright R.H., and Weiss S. 2006. Direct observation of abortive initiation and promoter escape within single immobilized transcription complexes. *Biophys. J.* **90:** 1419–1431.

Muller B.K., Zaychikov E., Brauchle C., and Lamb D.C. 2005. Pulsed interleaved excitation. *Biophys. J.* **89:** 3508–3522.

Nir E., Michalet X., Hamadani K.M., Laurence T.A., Neuhauser D., Kovchegov Y., and Weiss S. 2006. Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: Comparison between theory and experiments. *J. Phys. Chem. B* **110:** 22103–22124.

Rasnik I., McKinney S.A., and Ha T. 2006. Nonblinking and longlasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3:** 891–893.

Ratner V., Sinev M., and Haas E. 2000. Determination of intramolecular distance distribution during protein folding on the millisecond timescale. *J. Mol. Biol.* **299:** 1363–1371.

Ross J., Buschkamp P., Fetting D., Donnermeyer A., Roth C., and Tinnefeld P. 2007. Multicolor single-molecule spectroscopy with alternating laser excitation for the investigation of interactions and dynamics. *J. Phys. Chem. B* **111:** 321–326.

Sánchez-Mosteiro G., van Dijk E.M.H.P., Hernando J., Heilemann M., Tinnefeld P., Sauer M., Koberling F., Patting M., Wahl M., Erdmann R., et al. 2006. DNA-based molecular wires: Multiple emission pathways of individual constructs. *J. Phys. Chem. B* **110:** 26349–26353.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

Zhuang X., Kim H., Pereira M.J., Babcock H.P., Walter N.G., and Chu S. 2002. Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* **296:** 1473–1476.

Zhuang X., Bartley L.E., Babcock H.P., Russell R., Ha T., Herschlag D., and Chu S. 2000. A single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science* **288:** 2048–2051.


（曹静远　译）

# 第 6 章　采用偏振全内反射荧光显微术观察单分子的取向和旋转

**John F. Beausang** [*,†] **Yujie Sun** [*] **Margot E. Quinlan** [‡] **Joseph N. Forkey** [§] **Yale E. Goldman** [*,¶]

[*] Pennsylvania Muscle Institute and Nano/Bio Interface Center, [†] Department of Physics and Astronomy, and [‡] Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of San Francisco, San Francisco, California 94158; [¶] Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19140; [§] Precision Optics Corporation, Inc. , Gardner, Massachusetts 01440

## 摘要

这一章，我们介绍偏振全内反射荧光显微术（polarized total internal reflection fluorescence microscopy，polTIRFM）如何检测单个荧光分子的空间取向和旋转动态。polTIRFM 对结合到高分子特定部位的荧光探针的三维立体角的方向及其摇摆的程度进行定向。我们将 polTIRFM 与其他类似的显微术进行简略比较，介绍其物理原理和实验装置。以钙调蛋白（calmodulin，CaM）作为靶蛋白为例，我们将介绍使用双功能罗丹明（bifunctional rhodamine，BR）标记 CaM 的方法将双功能罗丹明-钙调蛋白（bifunctional rhodamine-calmodulin，BR-CaM）替换到肌球蛋白 V 上，并且用进行性运动检测法研究体外肌球蛋白 V 的运动性，这个检测过程是在附着于基底层的肌动蛋白上完成的。而旋转测定法用于检测稀疏标记在肌球蛋白层（附着于基底层）上的肌动蛋白微丝的滑动，之所以被称为旋转测定法是因为肌动蛋白在肌球蛋白的牵引位移时有时也围绕自身长轴旋转。

## 概述

大多数单分子实验都是为了测量某一分子与其配体作用或者在执行特定功能时结构、机械或者生化的动态特性。这一章我们主要讲述如何使用外来的、极化状态下的荧光探针产生的物理信号来检测分子的空间取向和旋转运动。这些检测到的分子信息可以用于结构动力学的研究。

旋转运动对于能量转换酶、分子马达、限制性内切核酸酶以及其他胞内“机器”都至关重要。举例来说，核糖核酸的螺旋结构意味着在脱氧核糖核酸（DNA）的复制和转录中解螺旋的重要性。例如，拓扑异构酶、解旋酶、转录激活因子和组蛋白修饰酶等酶促进了核糖核酸的处理以及脱氧核糖核酸的解旋、解链、解聚、包装和修复过程中的旋转运动（Pollard and Earnshaw 2002；Seidel and Dekker 2007）。在线粒体的 $F_1F_0$ ATP 合酶上，$F_0$ 亚基的跨膜质子梯度与 $F_1$ 亚基连接的轴转动相耦合。转动轴每转动

一周，能够催化二磷酸腺苷酸（ADP）磷酸化产生3个三磷酸腺苷（ATP）分子（Senior et al. 2002）。能源储存、协同运输和信号转导所需要的能量都是由晶体结构的高分子泵产生跨膜离子梯度提供，从而表明大角度倾斜运动对于泵的运行机制是至关重要的（Toyoshima and Inesi 2004）。肌球蛋白的轻链区域作为一个旋转杆臂将在ATP绑定位点的亚纳米级结构变化扩大到纳米级运动，以至沿着肌动蛋白的轴心推动货物（Goldman 1998；Geeves and Holmes 2005）。角位和杆臂的应力应变结构同样可自动检测负荷并通过反馈来控制马达的腺苷三磷酸酶循环的生化步幅。因而，探测这些高分子区域的取向和旋转运动对于理解它们的生理反应是至关重要的。

在本章，我们说明了如何利用polTIRFM测量单分子取向和旋转运动。我们讨论了polTIRFM的优点和局限性，并且比较了polTIRFM和其他单分子技术以及提供分子集合的旋转信息的大量实验。本章还包含了如何获得绑定在肌球蛋白或肌动蛋白上的单个荧光团的方位信息的实验方案。

## 单分子测量与集团测量的比较

为什么实验者要与细微的、大噪声的单分子信号搏斗？传统的生物化学和生物物理学综合实验所得到的信号强而且相对来说没有噪声，因为它们采用了大量的分子（通常远大于$10^{10}$）。但是，综合实验的一个基本缺点就是它的生物物理测量通过一个平均值得到，它放弃了单体差异。虽然这种差异可能不重要，但是一些丢弃的信息可能是了解基本机制细节的关键。如本章所述，单分子实验最主要的优点就是它直接观察了每一个分子的反应轨迹，这消除了平均带来的模糊。

在大量分子实验中，时间同步的缺乏、温度波动，以及分子的个体差异将导致它们属性的离散。散布的广度可详细地表征出来。例如，在核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）光谱结构中（Igumenova et al. 2006），它有可能因冷冻而暂时停止（Costello 2006），或者强迫各个分子在同构晶体中来消除它（Chiu et al. 2006）。但是，所有这些实验仍然需要对整体取平均。减小分子间温度差异常用的技术有间断的反应初始化使其同步（如断流实验）或者打乱它们的平衡（如温度跳跃）（Gutfreund 1995）。但是，组合单元的同步度将在若干步的反应后消失，这是因为酶反应或者同步传递的发生是不规则的。这种同步的快速衰退使得逆反应暂停和长时间反应轨迹（如信使核糖核酸的形成和转录）的观测十分困难。大分子的热力波动通常都是机械特性的关键。例如，肌球蛋白V的离散搜索下一个肌动蛋白绑定点（Veigel et al. 2002），这在平均值中通常是被忽略的。

对于取向或者旋转的运动，悬浮分子通常在空间中分布得松散，所以不能得到一个静态的方向。分子域之间和分子间旋转的广度和速度的起伏可以采用一个扰动来确定，如一个简短的偏振激光脉冲。偏振指的是电场的振荡方向，这可以用于优先激发沿电场方向排列的分子。这种光选择与大量分子旋转运动的半同步相似；这些光选择分子的子集以偏振激发的某个特定角度为方向。这种各向异性随分子旋转的相关时间而衰退，当子域的内部段旋转体现出来这种衰退将会更快（Lakowicz 2006）。激发态的寿命（对荧光通常是几纳秒，磷光是几毫秒）将旋转移动的观察时间限制在这些时间级别之内。

某些生物样本与常见的均匀材质不同，它们在结构组成上有方向性，如肌肉纤维、

脂质双层膜，以及多层脂质层片。在这种情况下，一个称为“导向”的对称轴表示了一个对比分子方向的参考轴。轴的角度在有序物体中很容易测出，而且具有稳定的机械特性。例如，与一个肌肉纤维轴相关的肌球蛋白杠杆臂的倾斜角度是产生力量的结构（Irving et al. 1995；Geeves and Holmes 2005）。但是，同样与机械特性相关的方向周围的方位角角度的信息是无法得到的。

通常，因为每个分子的轨迹都与其他分子区别开来，单分子实验不需要离散分子的同步。结果就是可以直接测量其结构的波动、逆转、暂停、反应闭锁时间、力以及位移。当需要某个平均参数时，可以通过单分子的求和平均得到。这些优点使人们不得不花费更大的努力在更好的信噪比和（或）更好的时间解析。带噪声的信号使得用仪器和样品统计辨别不停变化中的短暂的状态和罕见的事件需要仔细的分析（Min et al. 2005；Shaevitz et al. 2005）。

相反，对于共同作用的大量分子集合来说，某些分子独自或者以一个很小的集团进行运作。引导及使它们同步是不可能的，甚至会扰乱它们的功能。肌球蛋白 V 就是一个生物机械的例子，它近乎自行运作而不与相邻分子同步。在这种情况下，在大量分子中观测功能性相关的旋转是不可行的，而需要对单分子进行观察。这样，确定单分子取向和旋转的方法提供了完全的，有的时候是很关键的机械信息，这种信息由传统集团技术是很难或不可能得到的。

## 空间取向和旋转动态的单分子技术

从高分子的固有成分传送角度信息的信号，如羰基键的红外吸收和色氨酸残基的荧光，还没有强到可以单独地用某种可利用技术探测到的程度。这样，在单分子方位研究中，可以在感兴趣功能域加入一个标签或标记。小的聚合物小球和荧光支架微丝已作为有效的标记物，因为它们容易被光学显微镜观察到（Kinosita 1999；Ali et al. 2002；Hua et al. 2002；Gore et al. 2006）。小球具有可以用光学和磁陷阱旋转操纵的优点（Strick et al. 2000；La Porta and Wang 2004）。然而，这些标记物相对于标记功能域一般都比较大，并充分影响到了功能域的动态性（Kinosita et al. 2004；Shiroguchi and Kinosita 2007）。

相反，荧光探针是小分子，可以轻易引入到蛋白质和核酸的基因工程位点。对于测量已标记目标高分子的功能的完整性和动态性，显然它仍然是决定性的，最近大量成功的实例已有报道（Marks and Nolan 2006；Waggoner 2006）。为评估这些标记的蛋白质和核酸的位点和分布而设计出的实验已成为细胞生物学的主要方法。发展了具有超级分辨率的显微技术，可以提供在纳米等级精度的单个荧光团的位置信息（Yildiz et al. 2003），以及形成高于 50 nm 分辨率的图像（Hell et al. 2004；Betzig et al. 2006；Rust et al. 2006）。

在本章，我们集中在用 polTIRFM 确定荧光标记的分子的空间取向和旋转。在 polTIRFM 中，通过比较已知激发和探测偏振光的荧光发射的相对强度，探针吸收和发射的角度依赖性被用于确定它的三维定向。另外的一些单分子荧光偏振技术可直接绘出荧光分子散射图像的二维投影（Sick et al. 2000；Bartko et al. 2002；Kreiter et al. 2002；Lieb et al. 2004）。如第 3 章所述，散焦方位成像（defocused orientational and positional

imaging, DOPI）就是一个实例，显微镜有意地轻微散焦以强化散射分布图像的特征并揭示探针的取向。DOPI使得具有可用的角度和时间分辨率的偶极方向全半球的相对直接确定成为可能。同polTIRFM相比，DOPI中的仪器更容易操作且同时能确定探针的空间位置，这一功能仅部分被polTIRFM实现（Syed et al. 2006）。尽管DOPI的时间分辨率（0.5～1 s）小于polTIRFM（40～80 ms），但是在许多情况下，通过减缓生物反应可与试验方法的时间分辨率匹配，如降低基质浓度（Toprak et al. 2006）。两种技术的角度分辨率相差不大（10°～20°）。然而，polTIRFM对于探针（及标记的大分子）旋转摆动的速度及振幅比较敏感，而DOPI及其他相似技术却提供了一段记录门时间内的平均角度。

## 用于取向研究的荧光探针

荧光探针总是接近优先吸收和发出沿它们的偶极轴偏振光的电磁偶极。利用三环二苯丙吡喃衍生物荧光团（如罗丹明）及青色素衍生物荧光团（如Cy3），可见的吸收和发射偶极矩被校准为分子的长轴方向（Chen and Bowman 1965; Penzkofer and Wiedmann 1980）。由于探针绕自轴的方位角运动是不连贯的，相对于没有显示校准后的吸收和发射偶极矩的荧光团，这一性质简化了数据分析且增加了与荧光团相关的取向信息（van der Heide et al. 1992）。相对于目标分子的结构，拥有已知的稳定局部取向的探针具有特别的意义，因为它们光学偶极的取向直接与我们感兴趣的转动一致。Corrie等（1998）和Adams等（2002）描述了几种探针标记策略，这些探针包含两个或四个连接体且提供了两个连接物之间的固定局部取向。在另外的案例中，探针的局部取向可以用计算机模型（Sale et al. 2002）或X射线晶体推测（Otterbein et al. 2001）。

拥有侧面连接发光团的两个碘代乙酰胺接头的双功能罗丹明（BR; Corrie et al. 1998）已被用于肌球蛋白调节轻链的交叉连接的半胱氨酸（Cys或者C）残基（Corrie et al. 1999; Hopkins et al. 2002）、肌钙蛋白-C（Ferguson et al. 2003; Sun et al. 2006）和钙调蛋白（CaM）的研究。图6-1（左上角）显示了在随后的实验方案中用到的双功能罗丹明-钙调蛋白（BR-CaM），在此两个Cys残基分别位于CaM的一个α螺旋中7个残基（位点66和73）的两侧。这样，Cys残基的侧链几乎面向同一个方向、间隔两圈，并且可以通过双功能反应探针有效地交叉连接。虽然有些摆动（半圆锥角度，25°），探针偶极的方位仍然在两个Cys的β-碳原子之间排列（Mercier et al. 2003）。某些具有其他成对嵌入的Cys残基的突变体提供了已知的关于目标分子结构的不同的探针。这两个残基不需要包含在同一个螺旋体内（Hopkins et al. 2002; Brack et al. 2004）。可利用一种商业版本的BR，其具有更加刚性的连接体｛bis-[(*N*-iodoacetyl) piperazinyl] sulfonerhodamine; Invitrogen｝。这种化合物已证实被用于运动蛋白（kinesin; Sosa et al. 2001; Asenjo et al. 2006）和TnC（M. Irving, pers. comm）上的交叉连接的Cys残基，有可能在这两个被连接的氨基酸之间有一个更加受限的隔开范围（Sosa et al. 2001）。

在实验方案1中描述的标记CaM的方法是基于下述概念：在标记反应中保持相当低浓度的肽和游离双功能探针能改善有关不受欢迎种类的完全交叉连接产物的产率，如两个荧光团绑定在一个蛋白质上，两个蛋白质绑定在一个荧光团上以及高阶配对。这

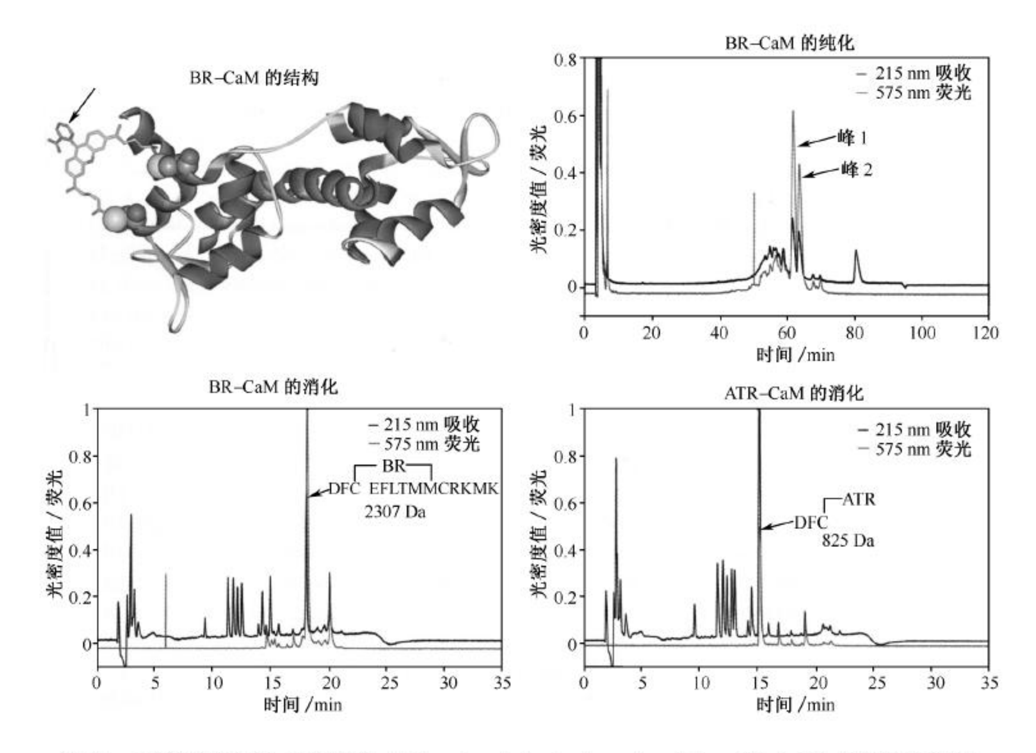



图 6-1 双功能罗丹明-钙调蛋白（bifunctional rhodamine-calmodulin，BR-CaM）的纯化和特征。CaM 的晶体结构（Houdusse et al. 1996）显示了 BR 本体的位置和取向（左上角）。箭头指向 BR 的羰基苯环，呈现在本图的右上角的产生两个非对映异构体峰值。标记后的 CaM 的反相（C18）HPLC 图（右上角）和胰蛋白酶消化片段（左、右下角）。

样，少量的探针接连地加入到反应混合液中。在用 2-巯乙基磺酸钠盐（sodium 2-mercaptoethanesulfonate，MESNA）终止标记反应后，混合液经有乙腈梯度的反相高效液相色谱仪（high-performance liquid chromatography，HPLC）纯化并被透析复性至交换缓冲液。记录在图 6-1（右上角）的 HPLC 显示出两个荧光标记峰值，每一个峰值表示一个蛋白质链对应一个荧光团以及 17 266 Da 的总质量。我们假设这两个峰值是具有面向相反方向的下垂羰基苯环（图 6-1，左上角）的同一的加合物的两个非对映异构体。这种异构体没有可测量的功能上的差异（Hopkins et al. 2002）。如凝胶迁移证实的那样（Burgess et al. 1980），纯化和复性 BR-CaM 保留了它的功能，并且当交换到肌球蛋白 V 和 VI 时不影响运动性。

为确认在标记的 CaM 中的两个 Cys 残基确实交叉连接，纯化后的荧光蛋白样本被内蛋白酶消化，分解邻近标记位点和两个连接 Cys 残基之间的肽。在这里讨论的 BR-CaM 的情况中，一部分相关的氨基酸序列是 GTIDFC̲EFLTMMC̲RKMKDTD，其中 BR 连接两个 Cys 残基的位点用下画线标出。内蛋白酶 Asp-N 分解在氨基酸末端的天门冬氨酸（aspartic acid，Asp 或 D）残基，并且在延长孵育的情况下，同样分解氨基酸末端成谷氨酸（Glu 或 E）。这样，蛋白质水解生成片段 DFC̲ 和 EFLTMMC̲RKMK，

但是在 BR 连接的 CaM 中，这两个肽通过荧光团以共价键连接，加上探针后预计肽质量为 2307 Da，如图 6-1（左下角）所示。一种用 5-碘代乙酰胺基四甲基罗丹明的对照实验，标记单个 Cys 突变体 GTIDFCEFLTMMARKMKDTD，产生片段 DFC-ATR，具有期望的 825 Da（图 6-1，右下角）。同样通过蛋白质水解片段的质谱分析已经分析了其他几种双功能标记蛋白（Corrie et al. 1999；Sosa et al. 2001；Ferguson et al. 2003）。

交叉连接末端产物的纯度和这些标记蛋白的功能测试是 polTIRFM 实验的基本问题。一种独立的分析方法是在与马来酰亚胺和聚乙烯乙二醇的硫醇衍生物反应后做凝胶转移实验以测定游离的硫醇和碘代乙酰胺（Kosolapov and Deutsch 2003）。这种技术一直被广泛用于检测新合成通道蛋白的折叠和寡聚化（Robinson et al. 2006），但它同样能正确地从 BR 标记反应的其他产物中辨别两个位点标记的 BR-CaM。

## POLTIRFM 的原理

全内反射荧光显微术（total internal reflection fluorescence microscopy，TIRFM）所产生的隐失场提供了单分子探测所需的低荧光背景。它的偏振直接受控于入射照明，并允许伴有沿着三个空间垂直方向偏振探针的鲁棒激发。产生沿常规或共聚焦显微镜光轴的偏振光是可能的但是更加复杂（Wilson et al. 2003）。与激发光的偏振相关的探针光学偶极取向强烈影响光的吸收及随后的发射总量。检测强度同样受探针和检偏器的相对位置的影响。通过依次采用几种已知的偏振光激发探针并同时在多种偏振器中探测荧光的散射，这两种影响可用于推断探针的三维取向。除静态空间定向外，偏振后的荧光信号提供了关于探针在纳秒时间级内运动的动态信息，并且还个别地提供微秒时间级内蛋白质运动的范围。这些运动归因于探针和蛋白质的旋转；它们体现为半角为 $\delta_f$ 的圆锥摆动和纳秒旋转相关时间 $\tau_f$ 及半角为 $\delta_s$ 的慢速圆锥摆动和微秒旋转相关时间 $\tau_s$。已有相关文献研究了这些附加信号的理论和应用（Ha et al. 1998；Forkey et al. 2000，2003；Rosenberg et al. 2005），然而这两个摆动运动的时间尺度还尚未在单分子水平的生物试验中全面开展。

这里，对于我们所讨论的 polTIRFM 装置，所有搜集到的荧光光子被用于确定取向信息，这也暗示着探针的精确空间位置不能同时被确定。这一局限不是基本的，而且位置和取向的同时探测是可能的（Enderline et al. 2005；Syed et al. 2006）。在 polTIRFM 中所确定的所有参数一共有 5 个：$\theta$、$\phi$、$\delta_s$、$\delta_f$ 和 $\kappa$。参数 $\theta$ 和 $\phi$ 分别是探针偶极的轴角和方位角，此时的坐标系统为 $z$ 轴指向显微镜的光轴而 $x$ 和 $y$ 轴落于显微镜的载物台（见图 6-2）。$\kappa$ 是所有搜集到的探针发射光的强度。

光子吸收/检测概率与激发/检测偏振器和偶极轴之间角度的余弦平方成正比。利用这种特性以及纳秒和微秒旋转振动（摆动）可建立一个模型，该模型可以通过 $\theta$、$\phi$、$\delta_s$、$\delta_f$ 和 $\kappa$ 等参数预测所测得的偏振荧光强度。因此，polTIRFM 根据与这些角度余弦四次方相关的灵敏度区分了空间取向。重要的是需要认识到偶极并不是一个指向唯一方向上的向量，而是指向两个方向（$\theta$，$\phi$）和（$180° - \theta$，$180° + \phi$）的一个对称杆。这种对称对于振荡偶极和电磁辐射是固有的，并且它将探测范围减小为一个半球。根据实验设备的几何尺寸，附加的对称可能存在不同的探针角度（如 $\phi$ 和 $-\phi$），这些探针角度能够进一步降低区分最终角度位置的能力和模糊数据的诠释。这些几何对称能够通过多

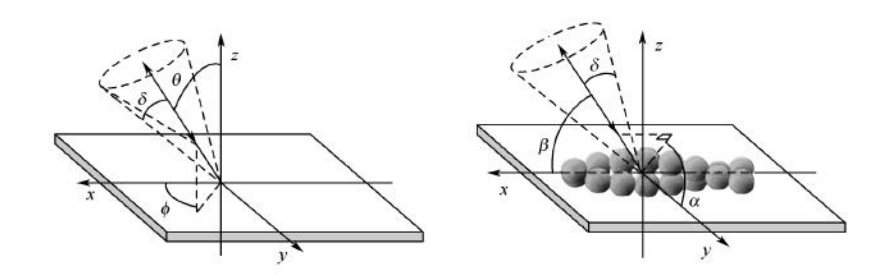



图 6-2　在显微镜参考系（左边）和肌动蛋白-微丝参考系（右边）中的角坐标，其中双头箭头代表荧光探针的偶极。

种激发/探测光路（包括在一个光路中的多种偏振）得到解决。

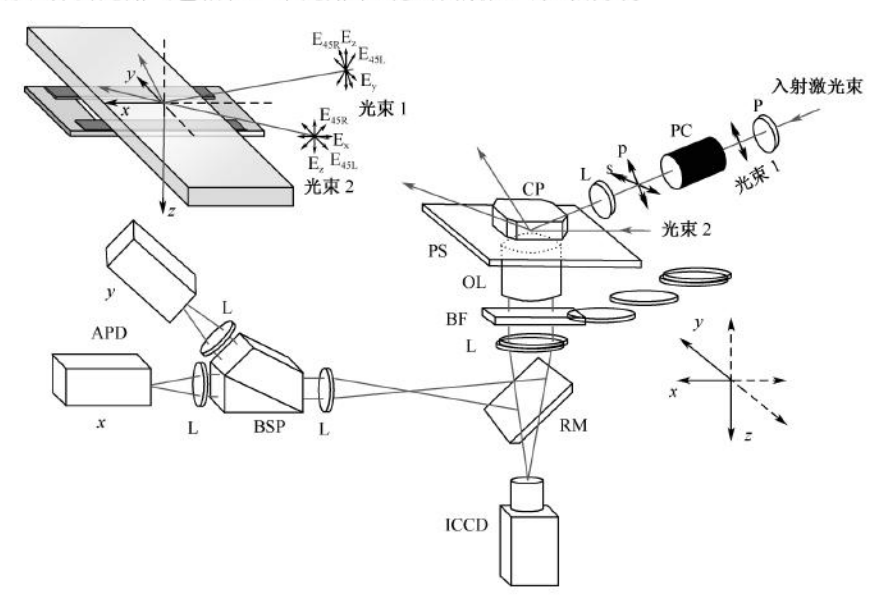



图 6-3　polTIRFM 试验设备。输入激光束（绿色）可以选择沿着光路 1 和 2 的方向。对于每个光路，光束经过一个线性偏振器（P）和一个电光调制盒（PC）产生可选择的平行于和正交于相关反射平面的线性偏振光（p 和 s）。通过耦合棱镜（CP）及折射率匹配液，光束被耦合进入石英显微镜载玻片。在石英/水界面上，全内反射发生，将光束通过耦合石英棱镜折回入一个束流收集器（图中没有显示）。石英载玻片（左上角）固定在一个压电载物台上（PS）。荧光（红色）由显微镜物镜（OL）搜集，经过带通滤色片（BF）并由透镜（L）成像。根据可移动反射镜（RM）的位置，荧光可成像在增强型 CCD 相机（ICCD）上或通过 Thompson 分束偏光棱镜（BSP）成像在两个雪崩光电二极管（APD）上。流量开关依据这两个光路定向（左上角）。

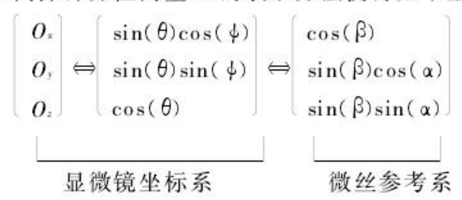
在我们的装置中，荧光发射通过显微镜物镜搜集，并通过一个偏振分束光栅投射到两个光子计数仪上，这样从图像平面分解成 $x$ 和 $y$ 偏振光（见图 6-3，见图版）。一个典型的试验结果是一组 8-16 测得的光束强度，这些光束强度对应于一个完整系列的激

发和检测偏振组合，该组合中（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）中的一组值是确定的。（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）的时程可以通过搜集激发偏振光的重复循环数据来获得。

当激光强度在 BR 或四甲基罗丹明不可逆转漂白前允许记录时间为 5～10 s 时，足够的发射光子（50～100）在 5～10 ms 时间内被记录并被用于估计 $\theta$ 和 $\phi$，估计的误差为 5°～15°。因而，对于能够分辨整个半球内方位的 8 个输入和两个检测偏振光，时间分辨率为 80 ms。这种技术的时间多元性要求探针荧光的光物理闪烁（眨眼）最小化但仍然保护探针以防止快速的不可逆转漂白。对于罗丹明和 Cy3，我们发现样品缓冲液中 50～100 mmol/L 二硫基苏糖醇（dithiothreitol，DDT）是有效的抗荧光猝灭试剂，并且发现这样能真正消除从酶去氧系统观测到的眨眼（Quinlan et al. 2005；Rosenberg et al. 2005）。最近的报道称，另一种氧化还原化合物水溶性维生素 E 可作为一种有效的不会产生眨眼的抗漂白添加剂（Rasnik et al. 2006）。

因为探针取向与强度非线性相关，需要数值技术根据 polTIRFM 强度确定（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）；由于是对低数量光子计数的统计数据具有相对较大的波动。我们提出了一个 C 语言编写的 Levenberg-Marquardt 算法，以发现（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）的组合，该组合使得探针模型计算的强度与实测强度吻合的可能性最大（Press et al. 1992）。相关方程式见 Forkey 等（2005），一个简单的 Mathcad 工作表见本章的参考文献 www.med.upenn.edu/pmi/members/goldman。

在每个实测强度的完整循环确定（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）后，由于试验装置的几何对称导致的角度不确定性必须得到解决。对于替代显微镜坐标系的生物或生理相关参考系，其合理选择使得数据的解释更为容易。例如，在马达蛋白的研究中，运动发生的骨架轨迹（如肌动蛋白）是一个自然参考系。$\theta$ 和 $\phi$ 被转化为 $\beta$ 和 $\alpha$，其中 $\beta$ 此时为肌动蛋白微丝相关的探针的轴角度在显微镜结构中沿 $+x$ 轴方向，而 $\alpha$ 是从 $+y$ 轴向 $+z$ 轴测量得到的方位角。三种不同探针方位向量 $O$ 的表示方法使得如下坐标转换更为容易：




接下来可直接进行如下变换 $\beta = \cos^{-1}(\sin(\theta)\cos(\phi))$ 及 $\alpha = \arctan2(\cos(\theta), \sin(\theta)\sin(\phi))$。注意 $\arctan2(x, y)$ 与标准函数 $\arctan(y/x)$ 相似，但是在一个较大的范围内（$-180° < \alpha < 180°$ 是 arctan2 以及 $-90° < \alpha < 90°$ 是 arctan）具有单值性。完成这个变换必须为 $\beta$ 和 $\alpha$ 的范围选择一个特殊的半球。例如，对于沿固定在一个显微镜载玻片上的肌动蛋白行走的分子马达（在进行性运动检验方法中，见实验方案 5），玻璃/水界面上水的一侧上的半球就是一个合理的选择。对于一个沿肌球蛋白改变位置的肌动蛋白微丝，该肌球蛋白黏附在载玻片上且用荧光染料稀疏标记（在旋转检验方法中，见实验方案 6），一个中心位于微丝轴（前面或后面）上的半球就是一个正确的选择。

## polTIRFM 的装置

一套 polTIRFM 装置包含三个光学系统：激发、收集和检测。激发系统包括激光（发出合适波长的光来激发荧光团）、普克尔盒（动态地改变偏振）、波片和反射镜（引导光束以必须的倾斜角度到达玻片/水界面形成全内反射）。由于激光强度可以容易地达到可用的激发率（伴有有限的光漂白），BR 和羧基四甲基罗丹明可用 532 nm 或者 514 nm的激光激发，并且使用比吸收峰 550 nm 短的波长进行激发最大限度地减少了由于散射而透过较长波长的发射光滤镜的激发光。

注意这些反射镜，特别是由多层薄膜组成的高反射系数介质镜，能够引进相位移动并且因此引入椭圆率反射，甚至可能毁坏预期的偏振。当希望得到的偏振光在包含入射和反射光束的平面（散射平面）正交（*s*）和平行（*p*）的偏振面之间时，将引入这种相位移动。贝雷克可变波片（New Focus，Inc.）是一种稳定的具有可调整的转动位置和双折射的机械相位补偿器，此双折射将由普克尔盒和反射镜产生的椭圆率偏振的发射光转换成通过调整普克尔盒上的电压形成的任意线性的偏振光束。通过一个十字线性起偏镜测试消光，我们可以调整电压和补偿设置，而该起偏镜安放在将其耦合进样本表面的棱镜或物镜前的每个光束中。

下面介绍一个下文实验方案中采用的棱镜型 polTIRFM 装置（图 6-3）的主要特征，详细内容参见 Forkey 等（2005）。为在石英载玻片（折光率，$n=1.46$）和含水试样（$n=1.33$）间的表面上产生隐失场，两个正交光束被选择性地通过一个 BK-7 玻璃棱镜以一个掠射角引入样本。显微镜载玻片位于电脑控制的压电载物台上的 $x$-$y$ 平面，光束 1 和 2 的发射光分别传播到 $x$-$z$ 及 $y$-$z$ 平面。每个光束被线性偏振为两个方向：*s* 和 *p*。光束 1 和 2 分别产生主要在 $y$ 和 $z$ 以及 $x$ 和 $z$ 方向上显著偏振的隐失波。对于 *p* 偏振光束，由于电场分量平行于样本平面的相移，隐失场近似为椭圆（见 Forkey et al. 2000）。分析软件可考虑这个微小的分量，但为了简化起见，我们更偏向于 $z$ 方向的主要分量。

通过每 20 ms 及偏振分光束选择竖向和水平向之间的激光偏振光，普克尔盒能实现两个光路之间的切换。如果这两条光路之间的消光不充分，则该设计在样本上易产生干涉条纹。由一个校正普克尔盒中任意热漂移的反馈回路，我们获得了两个光路之间的一个 1∶1000 消光比（Forkey et al. 2005）。任一光束的偏振光通过在每一光路中的普克尔盒每 10 ms 在竖向和水平向之间再次反复切换。光束通过相对长焦距透镜（100 mm）聚焦在样本平面，在样本上的照射区域大约为 50 μm×100 μm。切换光路和偏振光的结果是四个输入偏振光的一个 40 ms 的循环：*s1*、*p1*、*s2* 和 *p2*（分别对应于主要在 $y$、$z$、$x$ 和 $z$ 方向上的偏振光）。

传统的落射光照明显微镜包含可用于有效搜集单分子荧光发射的光学系统，该显微镜配备有 100×，1.2 数值孔径（numerical aperture，NA）水浸物镜。该高数值孔径物镜搜集的绝大部分光线通过一个大角度被折射，混合了另外一些正交偏振光并需要在分析过程中进行校正（Axelrod 1989）。在我们的装置中，使发射光通过低自发荧光的石英载玻片及通过一个很薄的玻璃盖玻片成像，从而最大限度地减少玻璃中高自发荧光的影响（图 6-4）。另外，结合大的激发光束角，厚的石英载玻片可确保玻璃棱镜发出的

自发荧光在物镜的观察视野之外。荧光发射通过两个滤光片（Chroma；HQ575/90M 和 HQ545LP），从而作为一个阻止散射激光被探测的带通滤光片。荧光通过可动的反射镜被引导至一个作为一般成像的增强型电荷耦合器（intensified charge-coupled device，ICCD）相机，或者通过一个偏光分束棱镜被引导至 $x$ 和 $y$ 偏振发射光探测的雪崩光电二极管（avalanche photodiode，APD）。

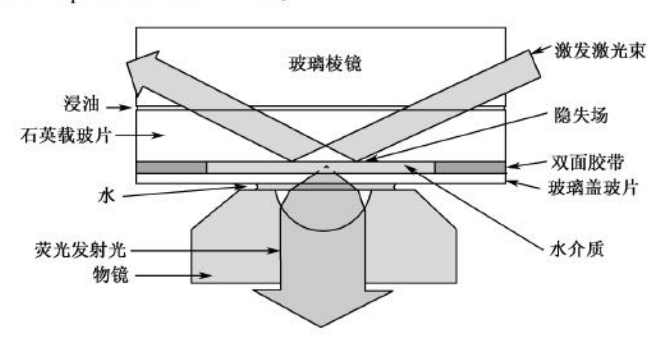



图 6-4　polTIRFM 装置截面图，显示了玻璃耦合棱镜、流动小室及显微镜物镜（未按比例绘出）。玻璃棱镜的自发荧光在观察视野的外部产生，这样不会显著影响到背景强度。

典型的，一个稀疏分布的荧光团的视野经过相机成像；在图像显示监视器上通过鼠标双击人工地选择单个荧光团；利用软件驱动压电载物台将该荧光团在 APD 上居中；然后确定可动的反光镜的位置引导发射光到两个记录 polTIRFM 信号的 APD 上。每个输入偏振光的两个输出偏振光导致每个循环有 8 个光强：${}_{s1}I_x$、${}_{s1}I_y$、${}_{p1}I_x$、${}_{p1}I_y$、${}_{s2}I_x$、${}_{s2}I_y$、${}_{p2}I_x$ 和 ${}_{p2}I_y$。注意这 8 个测量到的光强从多个方面决定了 5 个角度参数。

上述装置分解在球形的 1/4 范围内的角度（如 $0<\theta<90°$ 和 $0<\phi<90°$）。可以通过每一光束在竖向和水平向的中间（45°）位置结合附加的偏振光减少这种不确定性。在两道光束（对于总共 16 个被测光强，见图 6-3 左上角）的附加的偏振光增加了整个球形的角度范围（如 $0<\theta<180°$ 和 $0<\phi<180°$）。角度范围的增加要求附加偏振光的测量，总共 16 道路线，这样加倍了循环时间并减少了假设记录时间间隔的持续时间的时间分辨率。

## 用 polTIRFM 分析肌球蛋白和肌动蛋白

在随后的系列实验方案中，为确定荧光团的三维空间取向和旋转我们介绍了两种检验方法，进行性运动检验和旋转运动检验。在进行性运动检验中，用双功能罗丹明标记 CaM 并交换到肌球蛋白的杆臂上。随着肌球蛋白沿着固定的肌动蛋白微丝运动，当绑定的肌球蛋白头部在前一步和拖曳的位置上移步时，荧光团的空间取向（特别是 β）会改变。在旋转运动检验中，在涂上一层肌球蛋白的载玻片上用罗丹明稀疏标记的肌动蛋白微丝的位置发生改变。1/3～1/2 的滑动微丝发生轴向转动（如 α 角），因此在荧光探针上强加了一段螺旋状路程。这样的微丝称为旋转，并且当肌球蛋白 V 被驱动时，它们有一个稳定的大约为 1 μm 的左侧斜度。

最初的两个实验方案在用于进行性运动检验中标记肌球蛋白 V 杆臂是必需的。CaM 用 BR 标记，并且 BR-CaM 以低化学计量被用来与肌球蛋白的内源性 CaM 交换。实验方案 3 介绍了用于两种运动检验中的各种肌动蛋白标记方法。实验方案 4 介绍如何搭建流动小室（样本小室），在实验方案 5 和 6 中此流动小室被分别用于进行性运动检验和旋转运动检验。最后，在实验方案 7 中介绍了 polTIRFM 数据的获得和分析过程。如果可能，所有的溶液都用 0.2 μm 过滤器过滤，戴手套在超净台中用去离子水制备以防止样本污染。这里肌球蛋白 V 包含的技术可以广泛应用于在生物功能中具有重要机械功能的角度变化的其他单分子试验中。

## 实验方案 1：双功能罗丹明荧光标记钙调蛋白

本实验方案描述如何用双功能罗丹明（BR）在两个设计的半胱氨酸（Cys）片段（P66C 和 A73C）上标记鸡的钙调蛋白（CaM），这样可以交叉连接这两个 Cys 位点。由此得到的 BR-CaM 可以用高效液相色谱仪纯化，以及用过滤离心方法浓缩。为了确认标记 CaM 中的这两个 Cys 片段确实由 BR 交叉连接，一份纯化后的 BR-CaM 样本被内蛋白酶消化并做质谱分析。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

氩气< !>

Bisiodoacetamidorhodamine（双功能罗丹明，BR-I2；Corrie et al. 1998）

*也可以选用* bis-[（*N*-iodoacetyl）piperazinyl] sulfnerhodamine（Invitrogen，B10621）。

鸡的钙调蛋白（CaM）经基因工程用半胱氨酸（P66C 和 A73C）替换片段 Pro-66 和 Ala-73

*如 Putkey 等（1983，1985）所述的此蛋白质须由细菌表达并纯化。*

钙调蛋白，单功能 ATR 标记［作为对照组，见图 6-1（右下角）和上文，用于取向研究的荧光探针］

色谱溶剂 A［0.1% *m*/*V* 三氟乙酸（trifluoroacetic acid，TFA，Sigma-Aldrich，299537）］< !>

色谱溶剂 B［5% *V*/*V* 乙腈（acetonitrile，ACN，Fisher，A9984）< !>和 0.1% *m*/*V* TFA< !>］

透析缓冲液

10 mmol/L 三（羟甲基）氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）

30 mmol/L 氯化钾（KCl）

5 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）< !>

用氢氧化钾（KOH）< !>调节酸碱度 pH 至 7.0

*在使用前加入新鲜的 DTT。*

消化缓冲液（digestion buffer）［50 mmol/L 磷酸氢钠（$NaHPO_4$），pH8.0］

二硫苏糖醇（DTT；Fisher，BP172）< !>

内蛋白酶 Asp-N（测序级，Roche，11420488001）

标记用缓冲液［25 mmol/L Tris-Cl，pH7.4；100 mmol/L NaCl 和 2 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）（Sigma-Aldrich，E4884）］

液氮< !>

2-巯乙基磺酸钠盐（MESNA；Sigma-Aldrich，M1511）<!>

三(甲酰乙基）膦盐酸盐［tris（carboxyethyl）phosphine，TCEP；Invitrogen，T2556］<!>

## 设备

离心过滤装置（Centriplus YM-10，10kD cutoff；Millipore Corp.，4421）

脱盐柱（PD-10 Sephadex-G25 column；Amersham Biosciences）

透析管（12-14-kD cutoff；Fisher，132678）

高效液相色谱柱

分析反相色谱柱，C18（Grace VYDAC，218TP5415）

制备反相色谱柱，C18（Grace VYDAC，218TP510，包括保护柱 218GD54）

# 方法

## 用 BR 标记突变的 CaM

1. 用 15 ml 标记用缓冲液平衡 PD-10 脱盐柱。
2. 载入 150 nmol 单位的突变 CaM 到脱盐柱。用 1.5 ml 标记用缓冲液洗脱。
3. 确定洗脱后蛋白质浓度（如用 Bradford 生物分子定量检测法）并且用标记用缓冲液调整突变 CaM 浓度到 50 μmol/L。
4. 为还原二硫键，在室温下，将 CaM 放在 50 μmol/L 的 TCEP 中孵育 40～60 min。
   例如，对于 2 ml 的 50 μmol/L 的 CaM，加 100 μl 的 1 mmol/L 的 TCEP（pH 7.4）。
5. 加入 BR-I2 至终浓度为 30 μmol/L。
   例如，加 4 μl 的 15 mmol/L 的 BR-I2 至 2.1 ml 由步骤 4 得到的样本。
6. 在上述溶液中 20℃孵育。在 12 min、24 min 和 36 min 时，分别加入 20 μmol/L 的 BR-I2 补充液至终浓度为 90 μmol/L。
7. 在整个孵育时间达到 90 min 后，加入 MESNA 至浓度为 3 mmol/L 阻止标记反应。

## BR-CaM 的纯化

8. 在室温利用高效液相色谱仪（HPLC）在制备反相 C18 色谱柱上纯化 BR-CaM。
   i. 用 30%色谱溶剂 A 和 70%色谱溶剂 B 以流速 4 ml/min 平衡色谱柱。
   ii. 载入反应混合液到色谱柱。以下面的梯度流程洗脱。
   - 10 min，70%色谱溶剂 B 等度洗脱。
   - 40 min，70%～80%色谱溶剂 B 线性梯度洗脱。
   - 40 min，80%～85%色谱溶剂 B 线性梯度洗脱。
   - 1 min，85%～70%色谱溶剂 B 线性梯度洗脱。

   iii. 在 50 min 时开始收集 1.6 ml 分馏物。通过吸收光谱 λ=215 nm 和荧光光谱 $\lambda_{ex}$ = 549 nm，$\lambda_{em}$ = 560 nm 来监控蛋白质的洗脱。

洗脱图谱应该在各自的4～7 ml时显示两种不同的荧光蛋白峰值（如图6-1，右上角）。

9. 在HPLC运行的同时，在4℃下，利用吹氩气的方法，对4 L渗透缓冲液进行去氧处理至少40 min。在30 min时，加入5 mmol/L的DTT并继续吹氩气。

   由于DTT粉末在4℃的渗透缓冲液中无法溶解，所以DTT必须在加入渗透缓冲液之前在室温下溶解于1 ml的水（$H_2O$）中。

10. 在HPLC运行完后，立刻将这两种峰值对应的荧光蛋白（纯化的BR-CaM非对映异构体）转移至单独的渗透管。快速将每个渗透管放入500 ml冷的、去氧的渗透缓冲液中。

    将纯化后的BR-CaM快速转移到渗透缓冲液，以及预防氧污染对于最大限度减少蛋氨酸的氧化是必需的。

11. 在2 h和4 h后更换渗透缓冲液。在一直通氩气的情况下持续渗透样本一整夜。
12. 第二天，转移样本到离心过滤装置（Centriplus YM-10）。为浓缩BR-CaM蛋白，将样本在4℃（3000 *g*）离心直到容积达到1.5 ml或更少。间隔1 h后，停止离心，转移滤液至一个储存容器，并将滤液在冰上保存。在保留物中确认BR-CaM蛋白复性后（步骤16），将滤液丢弃。
13. 为复性此蛋白质，将过滤管倒转，然后在4℃用2000 *g*离心4 min，这样可以将蛋白质倒入管子的盖子上。
14. 将蛋白质分装成200 μl后在液氮中迅速冷冻。这些分装样本在－80℃至少可保存一年。

## 纯化的BR-CaM的分析

15. 用蛋白质比色测定方法（如带有BSA标准的Bradford检验法）确定染料在蛋白质上的染色比例。罗丹明发光团的吸收系数为 $\varepsilon_{547}=89\ 250\ \mathrm{M^{-1}\cdot cm^{-1}}$（Corrie et al. 1998）。

    这种配对包含每17 kDa的CaM肽对应一个发光团。

16. 利用分析反相高效液相色谱法，以流速1 ml/min分析标记后的蛋白质的纯度。
    i. 将15 μl（或3 pmol）的蛋白质样品放入已用色谱溶剂A平衡后的色谱柱。
    ii. 用色谱溶剂A冲洗色谱柱2 min。
    iii. 用0～100%的色谱溶剂B线性梯度洗脱蛋白质35 min以上。如步骤8iii监控吸收光谱和荧光光谱。
    iv. 在样本间用色谱溶剂A冲洗色谱柱。
17. 确认在标记的CaM中的两个Cys片段确实由BR交叉连接。
    i. 透析4 nmol的BR-CaM（或单功能ATR标记的CaM）到消化缓冲液中。
    ii. 加入3.2 μg的内蛋白酶Asp-N，并在37℃消化19 h。
    iii. 在沸水中孵育5 min，终止消化反应。
    iv. 用分析HPLC分离消化后的肽片段。以1 ml/min的流速，将消化后的样本装入有70%色谱溶剂A和30%色谱溶剂B的色谱柱。以下面的流程洗脱蛋白质。
       - 2 min，30%色谱溶剂B等度洗脱。

• 17.5 min，30%～100%色谱溶剂 B 线性梯度洗脱。

如步骤 8 iii 监控洗脱。收集 200 μl 的分馏物。

v. 通过电喷雾飞行时间质谱仪确认荧光片段的质量。

以两个荧光连接处裂开的两个位点标记的肽，保留了两个侧肽片段的质量（图 6-1，左下角）。

## 实验方案 2：荧光标记肌球蛋白 V：交换 BR-CaM 到肌球蛋白 V

这里我们描述了如何将 BR-CaM 与野生型钙调蛋白（WF-CaM）交换到肌球蛋白 V 的杆臂。BR-CaM 在低化学计量下进行交换（大约 0.4 个 BR-CaM 对应 1 个双头肌球蛋白 V），使得肌球蛋白与 BR-CaM 搭配，并且将比例限制为每个肌球蛋白配 2 个或者以上的探针。值得注意的是化学计量对于交换反应过程中的钙浓度非常敏感。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

氯化钙（$CaCl_2$）（31.34 mmol/L）< !>

将最初的标准 $CaCl_2$ 溶液（Fluka，21114）连续 5 次双倍稀释到水中就可以得到此浓度的 $CaCl_2$ 溶液。

钙调蛋白分子

BR-CaM（10 μmol/L），由实验方案 1 得到。

鸡的 WT-CaM（3.9 mg/ml），细菌表达（Putkey et al.，1985）。

乙二醇双（2-氨基乙基）四乙酸（EGTA，200 mmol/L，pH 7.5）（纯度>99%；Sigma-Aldrich，03778）

交换缓冲液

20 mmol/L 咪唑（pH 7.6）< !>

25 mmol/L KCl

2 mmol/L 氯化镁（$MgCl_2$）

1.0 mmol/L EGTA（浓度的精确性很重要）

5 mmol/L DTT < !>

从小鸡脑部得到的肌球蛋白 V，如 Cheney（1998）所述的方法纯化

存储缓冲液（100 mg/ml 蔗糖，在交换缓冲液中制备）

设备

离心过滤设备（100-kD cutoff；Pall Corporation，Nanosep OD100C33）

透析设备（10-kD cutoff；Pierce，Slide-A-Lyzer MINI 69570）

### 方法

1. 准备交换缓冲液并将其冷却到 4℃。
2. 在 4℃从 900 ml 交换缓冲液中透析 100 μl 的 WT-CaM 和 100 μl 的 BR-CaM（分别在不同的透析管中）。
3. 1 h 后，更换交换缓冲液。在 4℃透析一整夜。

4. 第二天，确定 WT-CaM 和 BR-CaM 的浓度（如用 Bradford 检验法）。
5. 混合 100 nmol/L 的肌球蛋白 V、100 nmol/L 的 BR-CaM 和 900 nmol/L 的 WT-CaM 到 200 μl 的交换缓冲液中。
6. 在 25℃孵育样本 5 min。
7. 加入 6.6 μl 的 31.34 mmol/L $CaCl_2$ 到样本。
   目前 $CaCl_2$ 的浓度为 1.00 mmol/L。
8. 在 25℃孵育样本 10 min。
9. 加入 4.2 μl 的 200 mmol/L EGTA 到样本。
   目前浓度为 4 mmol/L 的 EGTA 将终止交换反应。
10. 在 25℃孵育样本 10 min，然后将反应管放置在冰上。
11. 用过滤离心机按如下的方法移走多余的 CaM。
    i. 转移 200 μl 的反应混合液到离心过滤设备，并且在 4℃以 5000 *g* 离心 3～5 min。
    ii. 测量滤出液的体积。加入相同体积的存储液到保留下的溶液中，以恢复到原来相同体积。
    iii. 用移液管小心翼翼地搅动溶液，这样可以让附着在过滤膜上的任何肌球蛋白 V 成悬浮液。小心不要损坏过滤膜。
    iv. 重复离心和稀释过程（上述步骤 i～iii）4 次，通过过滤膜冲洗掉未结合的 CaM。
12. 将纯化的肌球蛋白分成小样速冻在－80℃。此小样可以冻存 6 个月。

# 实验方案 3：用于 polTIRFM 运动检验方法的微丝肌动蛋白的制备

本实验方案中，由纯化的、单节显性的肌动蛋白（monomeric actin，G-actin）聚合得到用于 polTIRFM 运动检测方法的微丝肌动蛋白（filamentous actin，F-actin）。整个过程包括：①从 G-actin 到未标记的 F-actin 的制备；②用 6′-碘乙氨四甲罗丹明（6′-iodoacetamidotetramethylrhodamine，6′-IATR）稀疏标记 F-actin 的制备；③混合未标记的、生物素化，以及罗丹明标记的单体 F-actin 的制备。同样用于 polTIRFM 检测方法的罗丹明-鬼笔环肽肌动蛋白可以通过类似于未标记的肌动蛋白的过程进行制备。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

### 试剂

肌动蛋白

Alexa-actin，如 Forkey 等（2003）所述的制备 AEDANS-actin 的方法，通过用 Alexa Fluor 647 标记 G-actin 制备

生物素标记的肌动蛋白（Cytoskeleton，Inc.，AB07）

G-actin，从兔肌肉中分离和纯化（Pardee and Spudich 1982）

罗丹明-肌动蛋白，通过用 6′-IATR 标记 G-actin 制备（Corrie and Craik 1994）

所有 G-actin 和标记后的肌动蛋白单体需要保存在 G-actin 缓冲液中。

4 倍 F-actin 缓冲液

300 mmol/L KCl

10 mmol/L $MgCl_2$

40 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）(在 20℃ pH 7.0～7.2)

G-actin 缓冲液

2 mmol/L Tris-Cl（在 20℃ pH 8.0）

0.2 mmol/L $CaCl_2$ < !>

0.2 mmol/L ATP（用时加入）

0.5 mmol/L DTT（日常由粉末制备）< !>

鬼笔环肽（Invitrogen，P3457）< !>

## 方法

1. 按要求的比例混合标记的和未标记的 G-actin（或只有未标记的 G-actin）（如参见插注 1 和 2）。混合均匀。
2. 加水、4 倍 F-actin 缓冲液（终浓度为 1 倍）和 1.1 μmol/L 鬼笔环肽（以这个顺序）

到步骤1得到的单体溶液中，这样肌动蛋白的终浓度为1 μmol/L。

3. 轻轻地混合溶液约10 s。

4. 在室温下孵育混合液10 min。

5. 将混合液置于冰上，在4℃可以保存1个月。

**插注1　稀疏标记的罗丹明肌动蛋白微丝的制备**

1. 将下列成分混合制备存储液A（总肌动蛋白浓度为75 μmol/L）：

　　9.5 μl G-actin缓冲液

　　9.5 μl 6.5 mg/ml的G-actin

　　1.0 μl 33.5 mg/ml的G-actin（包括13.5%的罗丹明标记的单体）

2. 按下列顺序加入以下成分到10μl的存储液A中：

　　552 μl的$H_2O$

　　187.4 μl的4倍F-actin缓冲液

　　0.6 μl 1.3 mmol/L的未标记的鬼笔环肽

3. 重复实验方案3中步骤3～5的过程。

　　最终得到的750 μl溶液中包括75 mmol/L的KCl（从F-actin缓冲液来）、1.1 μmol/L的未标记的鬼笔环肽、1 μmol/L的肌动蛋白单体，其中0.3%由罗丹明标记。

**插注2　biotin-Alexa肌动蛋白微丝的制备**

1. 混合34.7 μl 2.4 μmol/L的生物素化肌动蛋白（biotin-actin）和15.7 μl 26.5 μmol/L的Alexa-actin。充分混合。

2. 按下列顺序加入以下成分：

　　324.1 μl的$H_2O$

　　125 μl的4倍F-actin缓冲液

　　0.5 μl 1.3 mmol/L的未标记的鬼笔环肽

3. 重复实验方案3中步骤3～5的过程。

　　最终得到的500 μl溶液中包括75 mmol/L的KCl（从F-actin缓冲液来），以及1 μmol/L的肌动蛋白中生物素化肌动蛋白：Alexa-actin的比例为1∶5（0.17 μmol/L生物素化肌动蛋白，0.83 μmol/L Alexa-actin）。

# 实验方案 4：用于 polTIRFM 运动检验方法的流动小室的构建

本实验方案描述了如何构建用于 polTIRFM 运动检测方法的样品小室（如图 6-3）。每个小室可以容纳约 20 μl 溶液。为了使溶液流过小室，用移液管将溶液加入到小室，同时利用滤纸的毛细作用带走之前的液体。每一个盖玻片的末端必须延伸出载玻片的边界，这样才能支持移液管的尖端以及滤纸。可以通过调整滤纸和溶液间的接触面积大致控制流速。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

丙酮＜!＞
乙醇（100%）
氢氧化钾（KOH，200 mmol/L）＜!＞
聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）（2 mg/ml；Sigma-Aldrich，370037）＜!＞，在二氯甲烷＜!＞中制备

### 设备

盖玻片，玻璃制（24 mm×40 mm×0.17 mm，Fisher）。
等离子清洗机/灭菌器（Harrick Plasma，PDC-32G）。
载玻片，熔融石英制（1 mm 厚；Quartz Scientific）。
超声波破碎仪（Branson 3510）
匀胶机（Laurell，WS-400A-6NPP/Lite）
染色比色皿
双面胶（Scotch Double-Coated Permanent Tape，665）

## 方法

### 清洗载玻片

1. 将载玻片用清洁丙酮浸泡在染色比色皿中。
2. 在 38～40℃超声处理载玻片 5 min。
3. 用水冲洗载玻片三次。
4. 用 200 mmol/L 的 KOH 溶液超声处理载玻片 20 min。
5. 用水冲洗载玻片三次。
6. 用清洁乙醇（100%）超声处理载玻片 5 min。
7. 将载玻片放置在超净台中晾干。

8. 在进行实验（实验方案 5 和 6）之前，紧接着等离子清洁一片载玻片（由步骤 7 得到）5 min。
9. 将此载玻片安装在匀胶机上，以 5000 r/min 旋转，滴 18 μl 的 PMMA 到该载玻片上，等待 30 s 后制成一个 2～3 nm 厚的均质的 PMMA 薄膜。
   PMMA 薄膜以一种“树枝状”的图案微弱地散射光亮。
10. 沿着每个清洁后的盖玻片的长边放置一条 6 mm×30 mm 的双面胶条带，在它们之间留出约 10 mm 的间距。
11. 将盖玻片沿着正确的角度粘在载玻片的中间，制成一个流动小室（如图 6-3 和图 6-4）。
12. 为了密封边缘，用一个钝的物体在盖玻片和双面胶区域按压。

## 实验方案 5：polTIRFM 进行性运动检验方法检测肌球蛋白 V

在这个实验方案中，biotin-Alexa 肌动蛋白微丝通过生物素/链霉亲和素连接固定在载玻片上，并且利用流体流动沿显微镜 *x* 轴排列（如图 6-3）。当肌球蛋白沿着肌动蛋白微丝运动时，可以确定绑定在单个肌球蛋白 V 分子上的罗丹明探针的取向。在补充从肌球蛋白杆臂上丢失的 CaM 时提供额外的野生型钙调蛋白（WT-CaM）（在溶液名字中以“＋”标识）。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

#### 试剂

biotin-Alexa 肌动蛋白（1 μmol/L）（见实验方案 3）
  每日在 M5＋缓冲液中制备 1∶10 的 biotin-Alexa 肌动蛋白稀释液。
生物素化牛血清白蛋白（1 mg/ml）（Sigma-Aldrich，A8549），每月用 M5 缓冲液制备
运动溶液，当日用 M5 缓冲液制备
  10～1000 pmol/L BR-CaM 标记的肌球蛋白 V（见实验方案 2）
  2.5 mg/ml 牛血清白蛋白（BSA，Sigma-Aldrich，A0281）
  100 mmol/L DTT（每日在 M5 缓冲液中制备 1 mol/L 的 DTT 存储液）<!>
  100 μg/ml WT-CaM
  1～200 μmol/L ATP
肌球蛋白 V（M5）缓冲液
  25 mmol/L KCl
  20 mmol/L HEPES（20℃时 pH 7.6）
  2 mmol/L 氯化镁（$MgCl_2$）
  1 mmol/L EGTA（Sigma-Aldrich，E4378）
链霉亲和素（5 mg/ml；Sigma-Aldrich，S4762），每月用 M5 缓冲液制备
  在 M5＋缓冲液中 1∶10 的链霉亲和素稀释液必须当日制备。
冲洗缓冲液（M5＋），每日在 M5 缓冲液中制备 [10 mmol/L DTT（在 M5 中每日制备 1 mol/L DTT 存储液）<!>和 100 μg/ml WT-CaM]

#### 设备

滤纸（双层；Kettenbach，30761）
由实验方案 4 准备的流动小室
吸头（切割，见步骤 5）
polTIRFM 和分析软件（见文中，polTIRFM 的原理）

## 方法

1. 在实验方案 4 中制备的流动小室里循环 20 μl 1 mg/ml 的牛血清白蛋白。孵育 5 min。
2. 用 50 μl 的 M5＋冲洗流动小室。
3. 循环 20 μl 0.5 mg/ml 的链霉亲和素。孵育 2 min。
4. 用 100 μl 的 M5＋冲洗流动小室。
5. 用切割后的吸头循环 20 μl 1∶10 的 biotin-Alexa 肌动蛋白稀释液。等待 30 s。

   切割后的吸头最大限度地降低 F-actin 的剪切力。为得到良好排列的肌动蛋白微丝，在肌动蛋白的增加和冲洗过程中用双层滤纸增加流速。
6. 用 50 μl 的 M5＋冲洗。
7. 循环 20 μl 运动溶液。利用如实验方案 7 中详细说明的 polTIRFM 和分析软件记录并分析数据。

## 实验方案 6：polTIRFM 旋转微丝检验方法

在这个实验方案中，建立了滑行的微丝检验方法，此检验方法中稀疏标记的肌动蛋白微丝（0.3%肌动蛋白单体包含 6′-IATR）被固定在表层的一大片未标记的肌球蛋白 V 上转移。polTIRFM 旋转微丝检验方法不同于标准滑行微丝检验方法的地方在于整体微丝不可见，但是沿着每个微丝更独立地隔开了荧光团。目的是通过测量作为时间函数的荧光探针的空间角度，研究可能的肌动蛋白微丝在它的轴心附近的转动运动（如旋转）。成功的检验包括如下的显微视野：在 ATP 存在的情况下大约 50 个孤立的荧光点通过此视野。值得注意的是肌动蛋白一般被一个以上的肌球蛋白分子转移，依赖于微丝的长度和肌球蛋白表面密度。在一个时间点只能决定一个探针的方向，因而需要稀疏标记微丝。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜ !＞的材料。

试剂

ATP（2 mmol/L）

当日从 100 mmol/L 存储液（在 −20℃储藏，用前即刻解冻）中稀释到 M5 中。

牛血清白蛋白 BSA（5 mg/ml；Sigma-Aldrich，B2518），每月制备到 M5 中

当日用 M5＋制备 1∶10 的 BSA 稀释液。

微丝肌动蛋白（F-actin）

用 6′-IATR 标记（0.3%）（1 μmol/L）（参见实验方案 3）

当日用 M5＋制备 1∶500 的 0.3%用 6′-IATR（1 μmol/L）标记的 F-actin 稀释液。

未标记（70 μmol/L 的存储液）（制备类似于实验方案 3）

当日用 M5＋制备 1∶20 的 F-actin 稀释液。通过快速穿过 26 号针 10 次修剪肌动蛋白。

运动缓冲液，当日用 M5＋制备

5～50 μmol/LATP

10 mmol/L 磷酸肌酸（存储液储存在 −20℃并每日解冻；Sigma-Aldrich，P7936）

0.3 mg/ml 肌酸磷酸激酶（每日由粉末制备；Sigma-Aldrich，C3755）

50 mmol/L DTT（当日用 M5＋制备 1 mol/L DTT 存储液）＜ !＞

肌浆球蛋白 V（M5）缓冲液

25 mmol/L KCl

20 mmol/L HEPES（20℃时 pH 7.6）

2 mmol/L $MgCl_2$

1 mmol/L EGTA（Sigma-Aldrich，E4378）

肌浆球蛋白 V，未标记（约 0.2 mg/ml）。

聚 L-赖氨酰溴化氢（1.0 mg/ml；MP Biomedicals，71120）

冲洗缓冲液（M5＋），当日用 M5 制备［10 mmol/L DTT（在 M5 中每日制备 1 mol/L DTT 存储液）＜!＞和 100 μg/ml WT-CaM］

设备

滤纸（双层；Kettenbach，30761）

由实验方案 4 制备不含 PMMA 的流动小室

吸头（切割，见步骤 9）

polTIRFM 和分析软件（见上文，polTIRFM 的原理）

## 方法

1. 在实验方案 4 中制备的流动小室（制备时不含 PMMA）里循环 20 μl 的聚 L-赖氨酰。孵育 1 min。
2. 用 20 μl 的 M5＋冲洗。
3. 循环 20 μl 的未标记的肌球蛋白 V。孵育 2 min。
4. 用 20 μl BSA 稀释液循环两次。孵育 1 min。
   用于阻断暴露在外的玻片或聚 L-赖氨酰。
5. 循环 20 μl 稀释的、修剪过的、未标记的 F-actin。孵育 1 min。
   用于阻断不活跃的肌球蛋白头。
6. 重复步骤 5。
7. 循环 20 μl 的 2 mmol/L ATP。
   将未标记的肌动蛋白从活跃的肌球蛋白头处释放出来。
8. 即刻用 20 μl 的 M5＋循环两次。
   冲洗掉 ATP 和未结合的肌动蛋白。
9. 用切割后的吸头循环 20 μl 0.3%的 6′-IATR（1 μmol/L）标记的 F-actin 稀释液。孵育 1 min。
   切割后的吸头最大限度减少肌动蛋白的剪切力。
10. 循环 20 μl 运动溶液到最初的滑动。利用如实验方案 7 所述的 polTIRFM 和分析软件记录并分析数据。

# 实验方案 7：polTIRFM 数据的获得和分析

进行性运动检验方法（实验方案 5）和旋转微丝检验方法（实验方案 6）的数据收集和分析相类似。本实验方案描述了如何获得 polTIRFM 数据，然后校准装置。校准是对在光束强度中的任何系统变化和不平衡的探测器灵敏度进行校正，并且在记录到实验数据后对每一个载玻片完成校准。为了将光强转换成角度，从入射光强的一个完整的周期确定一组角度（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）。在路线中的每个循环重复此过程用来测量转动运动的时间依赖性。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

RhoB 校准液［50 nmol/L 罗丹明 B（激光等级；Acros，41900）和 5%二甲基甲酰胺（dimethylformamide，DMF）＜!＞］

DMF 将罗丹明对表面的黏附降到最小。

### 设备

如实验方案 5 或 6 中的流动小室

polTIRFM 装置（见图 6-3）和分析软件

## 方法

### 数据收集

1. 通过 ICCD 相机观察候选分子的视野。用短暂的、间歇的激光避免漂白。通过两种不同的颜色强调各帧画面的差别，在计算机显示器上添加连续的图像。
2. 通过双击图像选择以适于肌球蛋白异构重组和 ATP 集中的速度运动的分子。在磁盘上保存具有最初坐标的所选分子的视野，作为随后分析之用。
3. 凭借软件界面压电显微镜载物台和扫描反射镜（如图 6-3 中的 RM）移动到将探测器与所选分子排列到一起的位置。
4. 通过改变激发偏振角度连续地照射样本，同时收集发射荧光。为了以图像形式呈现出光强，用加权因子将单个偏振荧光光强踪迹相加成一个点的光强，这个光强对探测器的方位相对不敏感（见 Forkey et al. 2005）。

   激光的强度需要调整，使一个典型的记录周期（如 10 s）包括两部分内容：一是荧光信号约 2/3 记录时间及随后的漂白；二是背景强度测量占 1/3 记录时间。
5. 对于另外的分子，重复步骤 1～4。

## 校准

6. 在用于收集实验数据的同一个流动小室中，记录三组背景强度测量，尽量避免荧光分子（如必须没有漂白）。
7. 循环 20 μl 的 RhoB 校准液。
8. 测量三组 RhoB 荧光强度。
9. 循环 20 μl 的 $H_2O_2$ 两次。
10. 再测量一次背景，确保罗丹明分子不会黏附在表面（即从步骤 6 开始的强度是相同的）。

    冲洗后有高的背景光强说明罗丹明黏附在表面，可以假定校准荧光团的同向性分布是不能使人信服的。如果出现这种情况，可以增加 DMF 浓度或改变表面物质［如硝化纤维或聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）］。
11. 通过从步骤 8 测量的信号减去步骤 6 中测量的平均背景得到校准信号。
12. 修改探针模型以适应溶液中荧光团的各向同性分布（见文中，polTIRFM 的原理）。

    主要的差别是缓慢摇动的圆锥体，在这种情况下代表罗丹明分子的各向同性，延伸到所有角度；这样，消除参数 $\delta_s$、$\theta$ 和 $\phi$。修改后的探针模型预示，不同的偏振的光强稍微不同。实验偏差归因于不平衡的探测器灵敏度和光束强度。为解决这些仪器的非理想性，校准因子可以应用于实际数据。为了解详情，见 Forkey 等（2005）。

## 数据分析

13. 用在步骤 12 中确定的校准因子校正步骤 4 中得到的单独的强度轨迹。
14. 将从每一个分子得到的单独的强度轨迹临时结合成一个整体的强度信号。利用这个强度信号为以后的分析选择分子。

    所选的分子应显示：在一个恒定的光强之后跟随一个信号，即一种不连续的漂白至背景的变化。
15. 从每一个光强轨迹减去漂白后记录的背景。
16. 利用上文中描述的探针模型（见 polTIRFM 的原理）解答最适合测量强度的一组参数（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）。重复分析漂白前的所有完整周期。

    光强参数（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）的理论依据可在 Forkey 等（2005）中找到，一个简单的 Mathcad 工作表见本章的参考文献 www.med.upenn.edu/pmi/members/goldman。
17. 对所有结果良好的分子重复参数评估。
18. 典型的，（$\theta$，$\phi$，$\delta_s$，$\delta_f$，$\kappa$）并不是直接用来解释它们自身，必须转换到适合于生物系统的参考系。详情见上文（polTIRFM 的原理）。
19. 书写记录手稿。

## 致谢

此工作得到了美国国立卫生研究院基金（AR26846 和 AR51174）的支持，以及美国国家科学基金会 NSEC 纳米/生物界面中心（NBIC）DMR04-257 的支持。J. F. B. 通

过 NBIC DGE0221664 获得了 NSF IGERT 奖学金的支持。感谢 Philip C. Nelson 博士和 Jody A. Dantzjg-Brody 博士审阅该文并提出了有用的建议。

## 参考文献


Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., and Tsien R.Y. 2002. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **124:** 6063–6076.

Ali M.Y., Uemura S., Adachi K., Itoh H., Kinosita K., Jr., and Ishiwata S. 2002. Myosin V is a left-handed spiral motor on the right-handed actin helix. *Nat. Struct. Biol.* **9:** 464–467.

Asenjo A.B., Weinberg Y., and Sosa H. 2006. Nucleotide binding and hydrolysis induces a disorder-order transition in the kinesin neck-linker region. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13:** 648–654.

Axelrod D. 1989. Fluorescence polarization microscopy. *Methods Cell Biol.* **30:** 333–352.

Bartko A.P., Xu K., and Dickson R.M. 2002. Three-dimensional single molecule rotational diffusion in glassy state polymer films. *Phys. Rev. Lett.* **89:** 026101.1–026101.4.

Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., and Hess H.F. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313:** 1642–1645.

Brack A.S., Brandmeier B.D., Ferguson R.E., Criddle S., Dale R.E., and Irving M. 2004. Bifunctional rhodamine probes of myosin regulatory light chain orientation in relaxed skeletal muscle fibers. *Biophys J.* **86:** 2329–2341.

Burgess W.H., Jemiolo D.K., and Kretsinger R.H. 1980. Interaction of calcium and calmodulin in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **623:** 257–270.

Chen R.F. and Bowman R.L. 1965. Fluorescence polarization: Measurement with ultraviolet-polarizing filters in a spectrophotofluorometer. *Science* **147:** 729–732.

Cheney R.E. 1998. Purification and assay of myosin V. *Methods Enzymol.* **298:** 3–18.

Chiu W., Baker M.L., and Almo S.C. 2006. Structural biology of cellular machines. *Trends Cell Biol.* **16:** 144–150.

Corrie J.E.T. and Craik J.S. 1994. Synthesis and characterisation of pure isomers of iodoacetamidotetramethylrhodamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1:** 2967–2973.

Corrie J.E.T., Craik J.S., and Munasinghe V.R.N. 1998. A homobifunctional rhodamine for labeling proteins with defined orientations of a fluorophore. *Bioconjug. Chem.* **9:** 160–167.

Corrie J.E.T., Brandmeier B.D., Ferguson R.E., Trentham D.R., Kendrick-Jones J., Hopkins S.C., van der Heide U.A., Goldman Y.E., Sabido-David C., Dale R.E., Criddle S., and Irving M. 1999. Dynamic measurement of myosin light-chain-domain tilt and twist in muscle contraction. *Nature* **400:** 425–430.

Costello M.J. 2006. Cryo-electron microscopy of biological samples. *Ultrastruct. Pathol.* **30:** 361–371.

Enderlein J., Toprak E., and Selvin P.R. 2005. Polarization effect on position accuracy of fluorophore localization. *Opt. Express* **14:** 8111–8120.

Ferguson R.E., Sun Y.B., Mercier P., Brack A.S., Sykes B.D., Corrie J.E.T., Trentham D.R., and Irving M. 2003. In situ orientations of protein domains: Troponin C in skeletal muscle fibers. *Mol. Cell* **11:** 865–874.

Forkey J.N., Quinlan M.E., and Goldman Y.E. 2000. Protein structural dynamics by single-molecule fluorescence polarization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74:** 1–35.

———. 2005. Measurement of single macromolecule orientation by total internal reflection fluorescence polarization microscopy. *Biophys. J.* **89:** 1261–1271.

Forkey J.N., Quinlan M.E., Shaw M.A., Corrie J.E.T., and Goldman Y.E. 2003. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature* **422:** 399–404.

Geeves M.A. and Holmes K.C. 2005. The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv. Protein Chem.* **71:** 161–193.

Goldman Y.E. 1998. Wag the tail: Structural dynamics of actomyosin. *Cell* **93:** 1–4.

Gore J., Bryant Z., Stone M.D., Nöllmann M., Cozzarelli N.R., and Bustamante C. 2006. Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking. *Nature* **439:** 100–104.

Gutfreund H. 1995. *Kinetics for the life sciences: Receptors, transmitters and catalysts.* Cambridge University Press, Cambridge.

Ha T., Glass J., Enderle T., Chemla D.S., and Weiss S. 1998. Hindered rotational diffusion and rotational jumps of single molecules. *Phys. Rev. Lett.* **80:** 2093–2096.

Hell S.W., Dyba M., and Jakobs S. 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14:** 599–609.

Hopkins S.C., Sabido-David C., van der Heide U.A., Ferguson R.E., Brandmeier B.D., Dale R.E., Kendrick-Jones J., Corrie J.E.T., Trentham D.R., Irving M., and Goldman Y.E. 2002. Orientation changes of the myosin light chain domain during filament sliding in active and rigor muscle. *J. Mol. Biol.* **318:** 1275–1291.

Houdusse A., Silver M., and Cohen C. 1996. A model of $Ca^{2+}$-free calmodulin binding to unconventional myosins reveals how calmodulin acts as a regulatory switch. *Structure* **4:** 1475–1490.

Hua W., Chung J., and Gelles J. 2002 . Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science* **295:** 844–848.

Igumenova T.I., Frederick K.K., and Wand A.J. 2006. Characterization of the fast dynamics of protein amino acid side chains using NMR relaxation in solution. *Chem. Rev.* **106:** 1672–1699.

Irving M., St Claire Allen T., Sabido-David C., Craik J.S., Brandmeier B., Kendrick-Jones J., Corrie J.E.T., Trentham D.R., and Goldman Y.E. 1995. Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle. *Nature* **375:** 688–691.

Kinosita K., Jr. 1999. Real time imaging of rotating molecular machines. *FASEB J.* **2:** S201–S208.

Kinosita K., Jr., Adachi K., and Itoh H. 2004. Rotation of $F_1$-ATPase: How an ATP-driven molecular machine may work. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33:** 245–268.

Kosolapov A. and Deutsch C. 2003. Folding of the voltage-gated $K^+$ channel T1 recognition domain. *J. Biol. Chem.* **278:** 4305–4313.

Kreiter M., Prummer M., Hecht B., and Wild U.P. 2002. Orientation dependence of fluorescence lifetimes near an interface. *J. Chem. Phys.* **117:** 9430–9433.

La Porta A. and Wang M.D. 2004. Optical torque wrench: Angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Phys. Rev. Lett.* **92:** 190801.

Lakowicz J.R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York.

Lieb M.A., Zavislan J.M., and Novotny L. 2004. Single-molecule orientations determined by direct emission pattern imaging. *J. Opt. Soc. Am. B* **21:** 1210–1215.

Marks K.M. and Nolan G.P. 2006. Chemical labeling strategies for

cell biology. *Nat. Methods* **3:** 591–596.

Mercier P., Ferguson R.E., Irving M., Corrie J.E.T., Trentham D.R., and and Sykes B.D. 2003. NMR structure of a bifunctional rhodamine labeled N-domain of troponin C complexed with the regulatory "switch" peptide from troponin I: Implications for in situ fluorescence studies in muscle fibers. *Biochemistry* **42:** 4333–4348.

Min W., English B.P., Luo G., Cherayil B.J., Kou S.C., and Xie X.S. 2005. Fluctuating enzymes: Lessons from single-molecule studies. *Acc. Chem. Res.* **38:** 923–931.

Otterbein L.R., Graceffa P., and Dominguez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* **293:** 708–711.

Pardee J.D. and Spudich J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Cell Biol.* **24:** 271–289.

Penzkofer A. and Wiedmann J. 1980. Orientation of transition dipole moments of rhodamine 6G determined by excited state absorption. *Optics Commun.* **35:** 81–86.

Pollard T.D. and Earnshaw W.C. 2002. *Cell biology*. Saunders, Philadelphia.

Press W.H., Teukosky S.A., Vetterling W.T., and Flannery B.P. 1992. *Numerical recipes in C*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Putkey J.A., Ts'ui K.F., Tanaka T., Lagacé L., Stein J.P., Lai E.C., and Means A.R. 1983. Chicken calmodulin genes. A species comparison of cDNA sequences and isolation of a genomic clone. *J. Biol. Chem.* **258:** 11864–11870.

Putkey J.A., Slaughter G.R., and Means A.R. 1985. Bacterial expression and characterization of proteins derived from the chicken calmodulin cDNA and a calmodulin processed gene. *J. Biol. Chem.* **260:** 4704–4712.

Quinlan M.E., Forkey J.N., and Goldman Y.E. 2005. Orientation of the myosin light chain region by single molecule total internal reflection fluorescence polarization microscopy. *Biophys. J.* **89:** 1132–1142.

Rasnik I., McKinney S.A., and Ha T. 2006. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* **3:** 891–893.

Rosenberg S.A. Quinlan M.E., Forkey J.N., and Goldman Y.E. 2005. Rotational motions of macro-molecules by single-molecule fluorescence microscopy. *Acc. Chem. Res.* **38:** 583–593.

Robinson J.M., Kosolapov A., and Deutsch C. 2006. Tertiary and quaternary structure formation of voltage-gated potassium channels. *Methods Mol. Biol.* **337:** 41–52.

Rust M.J., Bates M., and Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3:** 793–795.

Sale K., Sár C., Sharp K.A., Hideg K., and Fajer P.G. 2002. Structural determination of spin label immobilization and orientation: A Monte Carlo minimization approach. *J. Magn. Reson.* **156:** 104–112.

Seidel R. and Dekker C. 2007. Single-molecule studies of nucleic acid motors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17:** 80–86.

Senior A.E., Nadanaciva S., and Weber J. 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by $F_1F_0$-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1553:** 188–211.

Shaevitz J.W., Block S.M., and Schnitzer M.J. 2005. Statistical kinetics of macromolecular dynamics. *Biophys. J.* **89:** 2277–2285.

Shiroguchi K. and Kinosita K., Jr. 2007. Myosin V walks by lever action and Brownian motion. *Science* **316:** 1208–1212.

Sick B., Hecht B., and Novotny L. 2000. Orientational imaging of single molecules by annular illumination. *Phys. Rev. Lett.* **85:** 4482–4485.

Sosa H., Peterman E.J.G., Moerner W.E., and Goldstein L.S.B. 2001. ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **8:** 540–544.

Strick T., Allemand J.F., Croquette V., and Bensimon D. 2000. Twisting and stretching single DNA molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74:** 115–140.

Sun Y.B., Brandmeier B., and Irving M. 2006 . Structural changes in troponin in response to $Ca^{2+}$ and myosin binding to thin filaments during activation of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 17771–17776.

Syed S., Snyder G.E., Franzini-Armstrong C., Selvin P.R., and Goldman Y.E. 2006. Adaptability of myosin V studied by simultaneous detection of position and orientation. *EMBO J.* **25:** 1795–1803.

Toprak E., Enderlein J., Syed S., McKinney S.A., Petschek R.G., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2006 Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 6495–6499.

Toyoshima C. and Inesi G. 2004. Structural basis of ion pumping by $Ca^{2+}$-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73:** 269–292.

van der Heide U.A., Orbons B., Gerrtsen H.C., and Levine Y.K. 1992. The orientation of transition moments of dye molecules used in fluorescence studies of muscle systems. *Eur. Biohys. J.* **21:** 263–272.

Veigel C., Wang F., Bartoo M.L., Sellers J.R., and Molloy J.E. 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat. Cell Biol.* **4:** 59–65.

Waggoner A. 2006. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10:** 62–66.

Wilson T., Massoumian F., and Juškaitas R. 2003. Generation and focusing of radially polarized electric fields. *Opt. Engr.* **42:** 3088–3089.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

（肖桂凤　译）

# 第7章　单分子水平的活细胞基因表达的成像

**Jie Xiao[*]　Johan Elf[†]　Gene-Wei Li[‡]　Ji Yu[§]　X. Sunney Xie[†]**

[*] Department of Biophysics and Biophysical Chemistry, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205; [†] Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138; [‡] Department of Physics, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138; [§] Center for Cell Analysis and Modeling, Department of Genetics and Developmental Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut 06030-3505

## 摘要

我们将要描述一种可以在单个蛋白质分子水平上对单个细菌细胞中基因的表达进行实时监控的方法。这种方法是基于对一段时间内分子空间定位数据的累积分析，从而使得单个荧光蛋白分子可以在细胞自发荧光的背景下得以被检测。这种方法同样可以用于研究转录因子与其操纵子和染色体DNA序列上的非特异结合位点的结合。这种方法在单分子水平和高时间分辨率上为活细胞内基础生命过程的研究创造了可能。

## 概述

在单个细菌细胞中一个基因一般有1～2个拷贝，一条mRNA一般有数个拷贝。虽然相应的蛋白质分子的拷贝数量从一到几千不等，但是很多重要的蛋白质（如转录因子）的拷贝数都很少（Guptasarma 1995）。这些低拷贝数的生物分子都具有一个共同的特点：它们所参与的生化反应本质上讲都是随机的。人们通过系统的研究发现随机效应对基因的表达具有突出的作用（Berg 1978; McAdams and Arkin 1999; Paulsson 2004）。因为通过对单个细胞基因表达的实时监测得到的信息比对一群同步化细胞得到的多，所以随机基因表达的实验研究需要一种对单个细胞进行实时监测的手段。然而在单分子水平上对单个活细胞内基因表达实时检测的技术难题直到最近才得以解决（golding et al. 2005; Chubb et al. 2006）。

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）和它的衍生物为生物学的研究带来了革命性的改变（Tsien 1998）。我们的方法也主要依赖于这些进展。但是利用GFP作为基因表达的报告子有两大难题。首先，荧光基团的成熟需要较长的时间。在三种构建荧光基团的氨基酸通过蛋白质折叠聚到一起之后，还需要经过大约20 min的氧化才能形成成熟的荧光基团（Miyawaki et al. 2003）。这给基因表达的监控在时间上带来了很大的限制。幸运的是Miyawaki研究小组改造得到了快速成熟的黄色荧光蛋白（yellow fluorescent protein，YFP）变体Venus（Nagai et al. 2002）。它只需要7 min便能完全成熟，从而大大改善了时间方面的问题（Yu et al. 2006）。

其次，在大肠杆菌细胞中通常需要 30 个拷贝的荧光蛋白分子（FP）才能在细胞自发荧光的背景下检测到信号。因为荧光蛋白分子在胞质中的扩散速度相当快，我们无法通过 CCD 检测器对一个细菌细胞内的单个自由扩散的荧光蛋白分子进行检测。在 100 ms的时间内，一个自由扩散的荧光蛋白分子可以跨越整个细胞质。因此它发出的荧光遍布了整个细胞并完全淹没于细胞自发荧光的背景里。通过对荧光蛋白分子在细胞内所处空间位置进行约束可以解决这个问题。使其发出的光子形成的是一个局限的衍射斑而不是整个细胞（图 7-1）。并且已经实现了对被约束在细胞膜上的单个荧光蛋白分子的检测（Harms et al. 2001b；Harpur et al. 2001；Lommerse et al. 2004）。

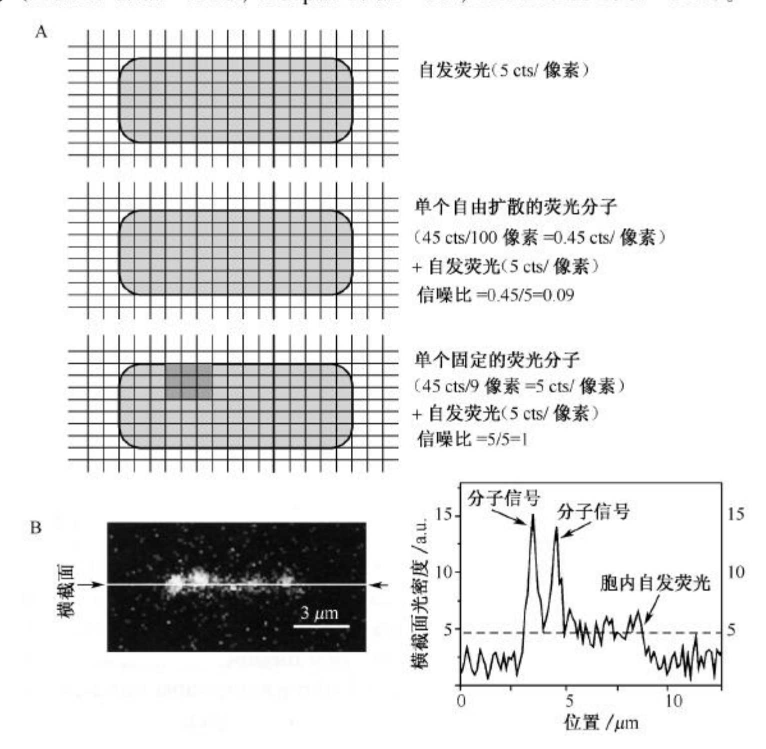



图 7-1　A. "静止检测" 的核心思想示意图（Watanabe and Mitchison 2002；Yu et al. 2006）。当在细胞内只有一些自由扩散的荧光蛋白分子（FP）时，在常规的 50～100 ms 的曝光时间里它们的荧光将遍布整个细胞并且信号和细胞自发荧光的比值很低。但是当一个荧光蛋白分子静止在细胞膜上、DNA 上或大的蛋白质复合体上时，它的扩散能力将大幅度削弱。在常规的曝光时间里其荧光所形成的是一个可以被检测到的清晰的衍射斑，其信噪比至少增强了 10 倍。B.（左）两个大肠杆菌表达带有膜定位序列的 Tsr-Venus 分子的荧光图像。在左边的细胞中检测到了两个独立的 Tsr-Venus 分子所形成的荧光衍射斑［半极大值全宽度（FWHM）约为300 nm］。这张荧光图像是利用波长为 514 nm，强度为 0.3 kW/cm$^2$ 的激光激发，在100 ms 的曝光后获得的（详情请见膜定位序列的选择）。（右）两个大肠杆菌细胞沿横截线轴发出的荧光信号。a.u.（arbitrary unit）为荧光单位。（B 图重印，得到了 Yu 等 2006［© AAAS］的准许）

在这一章我们将讲述通过不同束缚策略对单个活细菌细胞中单分子水平上检测的三个成功案例。第一种策略是通过检测细胞膜上新合成的蛋白质分子来监测蛋白质的合成。我们将一段膜定位序列与 Venus 相融合，并将它连于受到较高程度调控的 Lac 启动子的后面。一旦表达，这个带有膜定位信号的 Venus 将会很快折叠成熟并转运到细胞膜上，在膜上它们可以被独立检测到（图 7-2）。这让我们可以对蛋白质的合成进行精确的定量。这种方法是针对无法通过传统方法进行监测的表达水平较低的基因特别设计的一种监测方法。

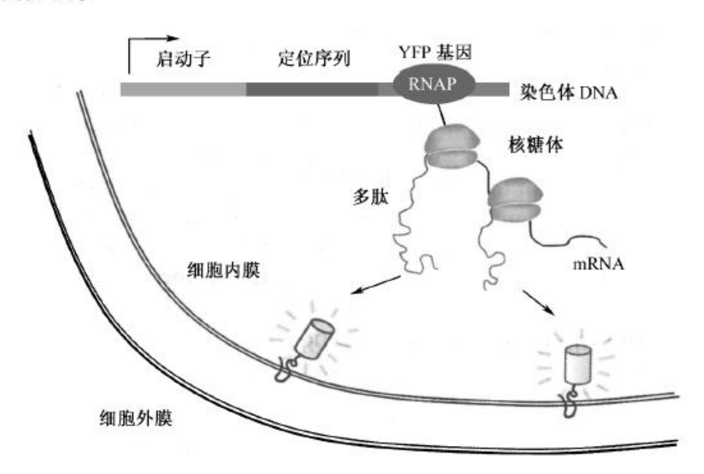



图 7-2 活细胞中观察基因表达的示意图。Tsr-Venus 在与 DNA 上 lac 操纵子紧密结合的 lac 抑制子的严格调控下表达。因为抑制子与 DNA 的短暂解离，使得 RNA 聚合酶转录得到一个 mRNA 分子。并通过核糖体的翻译得到了多个蛋白质分子拷贝。通过荧光显微镜我们可以检测到整合到大肠杆菌细胞内膜上单个 Tsr-Venus 分子所发出的荧光。（已修改，得到了 Yu 等 2006 [© AAAS] 的准许）

第二种束缚策略是让将标记了 Venus 的转录因子特异地结合到染色体 DNA 上面的特异位点。因为在数据收集的整个过程中染色体 DNA 是固定的，在转录因子与特异结合位点结合后，我们可以在单分子水平上对其进行检测。我们通过这个方法对 LacI 转录因子与 lac 操纵子的解离和结合过程进行了研究，采用高时间分辨率明确了 IPTG 诱导的动力学（Elf et al. 2007）。

第三种束缚策略是在单分子进行检测中利用短的激发脉冲。因为脉冲间的间隔较短，所以蛋白质分子不会移动很长的距离，就好像频闪摄影一样（Xie et al. 2006）。这使得我们对胞质内的单个荧光蛋白分子进行检测成为可能。当使用 0.3 ms 的激发脉冲时，我们可以观察到单个荧光蛋白成的是一个局限的衍射斑。利用这种方法我们得到了转录因子和 DNA 非特异位点结合的图像。频闪摄影可以用来测算蛋白质的移动能力。在使用最短的激发脉冲时只要图像上衍射斑的大小不发生改变，我们就可以估算出蛋白质和 DNA 相结合的平均停留时间的上限（Elf et al. 2007）。

基于群体的传统基因表达研究方法包括 Northern blotting、Western blotting、DNA 芯片和质谱，对于单个细胞中低水平表达的基因检测显得不够灵敏。另外一些自

然随机的基因表达被这些整体的测量所掩盖。这一章所介绍的方法让我们将活细胞基因表达的研究带进了单分子水平的时代，为生命科学的研究打开了一道激动人心的机遇之门。我们将讨论如何通过膜定位报告子对基因表达进行研究，这部分包括显微镜设置、样品制备、显微镜实验和数据分析处理。我们也将讨论用于研究转录因子与 DNA 之间特异和非特异结合的监控方法，主要集中在和前一种方法不同的细节上。本章还包括了玻片处理、准备样品和拍摄慢速电影的方法。表 7-1 总结了在本章试验中所需用到的仪器和设备。

**表 7-1 显微镜设备**

| |
|---|
| 声光调制器（acousto-optic modulator，AOM）和驱动器（LiCONix 40 MHz） |
| CCD 照相机 |
| Cascade 512B（用于 DNA 结合） |
| VersArray 1024，Roper Scientific Inc.；半导体超低温制冷，Princeton Instruments（用于基因表达） |
| 分光镜（Q525LP） |
| 电导快门（Uniblitz） |
| 发射光滤光器（HQ545/30 nm；Chroma Technology Corp.） |
| 激发光滤光器（HQ514/10 nm；Chroma Technology Corp.） |
| 聚焦马达驱动器（ASI） |
| 倒置显微镜（Olympus IX71） |
| 电动载物台（ASI MS-2000 XYZ linear encoded） |
| 激光器（Coherent Innova Sabre DBW10） |
| 物镜（Olympus PlanApo 60×1.45 oil TIRFM） |
| 可加热物镜（Bioptechs） |
| 可灌流细胞培养器（Bioptechs FCS2） |

## 利用膜定位报告子来研究基因表达

### 荧光蛋白的选择

目前用于活细胞中监控基因表达和蛋白质定位的最流行的方法都是基于绿色荧光蛋白及其衍生物（Tsien 1998）。只有当荧光蛋白的成熟时间变得足够短，那么基因表达实时成像时观察到的基因表达活动的快速动力学过程才是可信的，并且荧光蛋白只有足够亮才能使它在细胞自发荧光的背景中被检测到。在已报道的各种可以获得的荧光蛋白中，先前提到的黄色荧光蛋白变体 Venus，是本章实验的最佳选择，因为它完全满足前面提到的两个条件。据报道，Venus 在大肠杆菌中的成熟速度非常快（$\tau=7$ min）（Yu et al. 2006），而它的亮度几乎达到了目前流行的橙色荧光素染料的 80%（Shaner et al. 2005）。最激动人心的是和黄素相比，Venus 具有红移（515 nm）的性质。黄素是造成细胞自发荧光的主要原因（Benson et al. 1979；Harms et al. 2001a）。另外，Venus 的荧光基团的光稳定性较低，对于很多其他目的的成像不具备优势，但是对本章中提到的方法却具有额外的优势（Shaner et al. 2005）。因为低的光稳定性使它可以很快通过光漂白的手段快速削弱积累的荧光信号（更多细节，详见显微镜实验部分）。因为以上这些原因除非出现更亮、成熟更快的红色荧光蛋白，否则 Venus 依旧是本章提到的方法

的最佳选择。

## 膜定位序列的选择

要想让活细胞内单分子检测获得成功，其关键在于要束缚荧光蛋白的扩散和利用荧光信号够亮的荧光蛋白。当一个荧光蛋白分子在胞质内做自由扩散时，在我们获取图像的这段时间内它的荧光信号就可以遍布整个胞质并淹没在细胞自发荧光的背景中。那么如果将一段膜定位序列与 Venus 相融合，我们就可以将荧光报告子束缚在细胞膜上。一旦报告子蛋白被表达，它将很快被定位于膜上，并且其形成的荧光信号是一个局限的衍射斑。那么只要大幅度提高信号和背景噪声的比值，膜表面的单个报告分子就可以被检测到（图 7-1）。

我们将通过一项对甲基化依赖的趋化受体蛋白（methylation-dependent chemotaxis receptor protein，MCP）的研究来讲述这个方法（Mowbray and Sandgren 1998）。Tsr 被作为膜定位序列融合在 Venus 序列的 5′端（图 7-2）。整个融合蛋白（Tsr-Venus）的长度为 815 个氨基酸。这个报告子被用来对大肠杆菌中受到严格调控的 lac 启动子的转录活动进行监控（Yu et al. 2006）。在选择与 Venus 相融合的膜定位序列时有几个因素需要考虑。首先，融合后的基因不能改变启动子转录后的表达水平。这可以通过 Western blotting 比较内源基因和连接了报告子之后基因的表达水平来确定。其次，融合蛋白能够被快速有效地转运到膜上，这样就不会因为报告子在胞质内积累而增强背景荧光。在细胞内过表达融合蛋白之后我们可以在显微镜下对荧光的成分进行分析或在裂解细胞后利用 Western blotting 检测胞质部分中的蛋白质成分来进行确定。最后如果选用的是大肠杆菌内源的膜定位序列，那最好确定将因外源融合蛋白表达而给细胞正常功能所带来影响降到最小。

膜定位报告子是专门为那些表达水平较低的无法通过常规 DNA 芯片和质谱方法检测到的启动子设计的。这种检测方法不能用于检测表达水平相对较高（在每个细胞中有超过 50 个拷贝的蛋白质分子）的基因。即使我们每次可以通过对荧光强度的整合来估算出总的被表达的蛋白质分子数量，但随着被表达的蛋白质分子数量的增加计算的精度将不断下降，这将在空间和时间上带来很大的限制。

## 荧光显微镜装置

优化的荧光显微镜系统是成功进行单分子检测的必备条件。很多显微镜系统虽组件不同但均具有单分子检测的能力。下面提到的一些组件是在单分子水平上拍摄活的大肠杆菌的慢速电影时所必需的。①以高能量的氩离子激光器（在 514 nm，>500 mW）代替汞灯作为激发光光源。具有高能量的单线激光输出保证了对荧光基团的最大激发。②一台冷却型 CCD 照相机，在峰值检测波长具有较高量子效率（>0.9）。③显微镜需要配备 *x*、*y*、*z* 三轴电动精密移动平台，以便同时在多个区域内成像和自动聚焦。自动聚焦对于自动慢速电影的拍摄十分重要。因为由于平台不稳和温度波动所导致的失焦是提前造成实验失败的最主要原因。通过利用一些商业软件如 MetaMorph（Universal Imaging Inc.）可以在微分干涉差（differential interference contrast，DIC）或相差模式下实现自动对焦。由于自动对焦是基于荧光，所以为了避免问题发生应尽量避免荧光基

团被光漂白。④一个合适的滤光器组、分色镜和一个高数值孔径（numerical aperture，NA）的物镜对于一套优化的单分子成像系统同样重要。

我们在这里将列举一套上述的显微镜系统。这套系统包括 Olympus IX71 倒置显微镜，并配置了 ASI 的 $x$、$y$、$z$ 三轴电动精密移动平台，6 位的滤光器转换盘，DIC 聚光器，半导体制冷（−70℃）的 CCD 摄像机 VersArray 1024（Roper Scientific Inc.）和 Coherent Innova Sabre 氩离子激光器。所有的组件均通过 MetaMorph 来进行控制。一个高数值孔径（numerical aperture，NA）的物镜，如 Olympus Plan Apo 60×/1.45oil 全内反射显微镜（TIRFM）和一组黄色荧光蛋白的滤光器，如一个 514/10 nm 的超窄带激发光滤光器、一个 525 nm 的 LP 分色镜和一个 545/35 nm 的发射光滤光器。发射光滤光器可以在最大限度内除去激发光同时最有效地滤过发射光光子。

除了上面提到的这些组件之外，我们还需利用在激发功率密度为 300～400 W/cm$^2$ 的强激光来制造一个直径为 20 μm 小范围均匀照明域。要做到这一点就需要一套透镜组。通过透镜组将激光束聚焦到物镜的后聚焦面上，利用一个较小的锥角来制造一个直径 100 μm 的照明域。我们可以通过对光圈的调节来限制调整激光入射光的边缘部分，因为只有照明域中央直径约 20 μm 的区域才可用于成像。对照明域的正确设置是降低背景和确保均匀激发的最有效方法。图 7-3 是显微镜的内部结构的示意图。

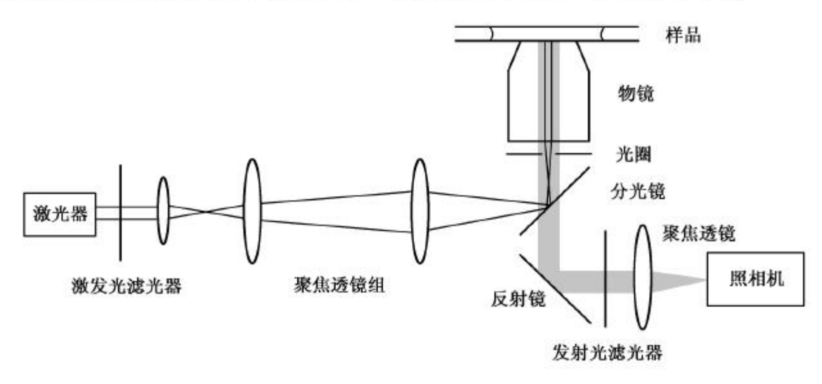



图 7-3　显微镜结构示意图。激光束通过超窄带激发光滤光器、一系列的透镜、分光镜和光圈在物镜的后聚焦面上制造了一个小照明域。被激发的荧光穿过相同的物镜聚焦到一台冷却型 CCD 照相机上，从而实现数据的收集。

## 样品制备

只有在一个具有良好密闭性能的细胞培养皿中，细胞才可以在一个恒温的条件下存活几代而不会因为水分蒸发而死亡。原则上我们可以用胶水将两个盖玻片以三夹板的形式黏合在一起，并在中间层（胶水层）的中央留下一个厚约 1 mm 的开放空间作为细胞培养皿使用。方法 2 中使用的是一种可以购买到的细胞培养器（Bioptechs，FCS2），其结构大同小异。在这个产品的网页上有这种细胞培养器的详细信息。图 7-4 是该产品的结构示意图。在下方的盖玻片和上方的载玻片之间是一个带有矩形槽的橡胶衬垫。为了让载玻片与中间空隙完全覆盖，载玻片被设计成了圆形。虽然说整个细胞培养器是密封

的也没有液体的灌流，但是只要实验需要也可以很快地将组件换回标准模式。在这里我们只对非灌流组件进行讨论。将琼脂糖和培养液配制的小滴置于载玻片和盖玻片中间夹层的中央。相互独立的大肠杆菌细胞处于底部的盖玻片和琼脂胶垫之间。琼脂胶垫周围大量的空气为细胞克隆的生长提供了充足的氧气储备。方法 2 讲述了样品制备的一些细节。

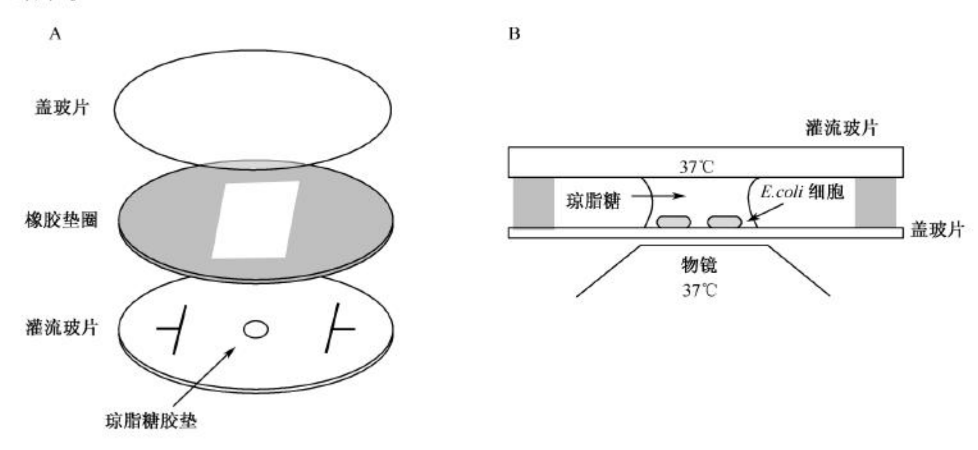



图 7-4　细胞培养器的结构示意图。A. 细胞培养器的组装顺序是从上往下的；B. 设置在显微镜上的细胞培养器的截面图。

## 显微镜实验

方法 3 将讲述如何成功拍摄一部缩时电影。因为研究者们所使用的显微镜系统和操作软件都各不相同，我们不可能针对每套系统做详细的说明。所以在这里我们只对其中适用于大多数系统的一般原理进行讨论。

在获取图像的时候通过延长曝光时间（如从 100 ms 延长到 1 s）来获得一个较高的荧光读数是极其不明智的。主要有下面三个原因。第一，Venus 的荧光基团很容易发生光漂白。在先前提到的强激光下，平均只要 250 ms 就能够让它发生光漂白。当它被光漂白之后，随着时间的增加背景会不断增高，从而大大降低了信噪比。第二，因为延长了曝光时间荧光基团发生光漂白的时间各不相同，使得各处整合的荧光强度值参差不齐。第三，即使膜上 Venus 的荧光基团在 100 ms 的时间内几乎不发生移动的，但它在长时间的曝光时间中也会出现一定程度的扩散。那么在这种情况下我们得到的很有可能就是一种张模糊的图像，并且荧光读数也会降低。在激光对细胞造成最小损伤的前提下，连续获取图像时间隔 3 min 已经是允许细胞继续生长的极限。要知道时间间隔是否合适，那么就要记录比较在显微镜阶段细胞的分裂时间和在搅动的液体培养基中细胞的分裂时间。一般来说由于在显微镜实验阶段受到光损伤或发生其他的应激反应，细胞在分裂1～2 个世代之后就会停止分裂。但是在通常情况下一个大肠杆菌在 5 h 内分裂所产生的后代已经开始堆积起来，而不仅仅是铺满一层，如果发生了这种情况那么实验就必须停止。

在光漂白这一步需要把先前检测到的所有成熟的荧光蛋白全部漂白。例如，在100 ms的曝光获取图像之后，再进行1000 ms的曝光以将所有已被检测过的荧光蛋白漂白，在这个过程中并不保存数据。间隔3 min后再次曝光100 ms以获取图像，马上再进行1000 ms的曝光以将被检测过的荧光蛋白漂白。因为在前面一轮的光漂白过程中已将所有成熟的荧光蛋白漂白，所以在后轮的100 ms中我们检测到的荧光信号都来自于新合成的荧光蛋白。这种光漂白的方式避免了荧光信号的积累，同时也让我们可以对实时合成的Venus蛋白分子进行精确的计数。这个方法既不需要额外的高能激光也不需要复杂的显微镜组件。但是因为不同显微镜系统的激发能量不同，所以曝光时间、间隔时间和光漂白时间需要通过进一步的实验来确定。一般来说光漂白的时间至少设置为在相同的成像条件下测得的光漂白时间常数的4倍（如光漂白半衰期的6倍）。相对于其他的荧光蛋白，Venus的荧光基团稳定性较低，使得光漂白时间相对较短，从而减少了激光对细胞所造成的伤害。

## 数据分析处理

数据分析处理主要有三个步骤：①计算出荧光电影中每帧图像上表达的荧光蛋白分子的数量；②利用光镜图像标记出每个细胞中的分子；③以时间为轴做出每个细胞谱系的基因活动状态图。

第一步可以通过一些商业的图像软件如MetaMorph、SlideBook（3I imaging Inc.）或通过Matlab和C＋＋自行编写程序来完成。一般来说是通过设定阈值来对荧光电影中每帧图像上的单个融合荧光蛋白发出的衍射斑进行识别。一个衍射斑的荧光强度是通过将围绕在衍射斑中荧光强度最大的像素周围的一定数量的像素的荧光强度相加并减去背景得到的。用于整合的像素的数量应该等于或少于衍射斑的尺寸。例如，如果最大荧光强度周围的9个像素（3×3）对应于一个400 nm×400 nm的区域，那么显微镜系统就应该配备一个100倍的物镜和一台像素尺寸为13 μm的照相机。整合的荧光强度应该和在体外单分子所测得荧光强度相一致。将荧光蛋白克隆到表达载体中并在其碳端带上亲和标记，在过表达之后通过亲和纯化柱进行纯化。很多公司（如英骏和普洛麦格）都提供了一步法纯化蛋白质试剂盒。通过上述方法从50 ml培养液中纯化得到的荧光蛋白已经能够满足体外单分子检测的需求。将荧光蛋白样品固定到载玻片上的过程，包括在盖玻片上涂布链霉亲和素和将纯化后的荧光蛋白进行生物素化等，其具体的方法将在后面的第21章中讨论。

在偶然情况下会有两个或更多的荧光蛋白分子聚集在一起，无法通过空间束缚的方法来解决。这个情况下就要把整合荧光强度超过单分子的平均荧光强度的那部分分子去掉。

第二步利用光镜图像标记出每个细胞中的分子。通过将荧光图像和光镜图像相叠加，人工标记出每个细胞。这一步可以通过一些自己编写的程序来完成，但是当一些点出现在细胞边缘的时候，程序有可能会出错，所以在最后必须经过人工矫正。我们在拍摄荧光图像和光镜图像的时候必须使用同一台照相机而不是两台不同的照相机。

最后一步，以时间为坐标轴做出每个细胞谱系所产生的蛋白质分子数量图。这种分析方法在以前的文献中也有报道（Yu et al. 2006），如图7-5所示。

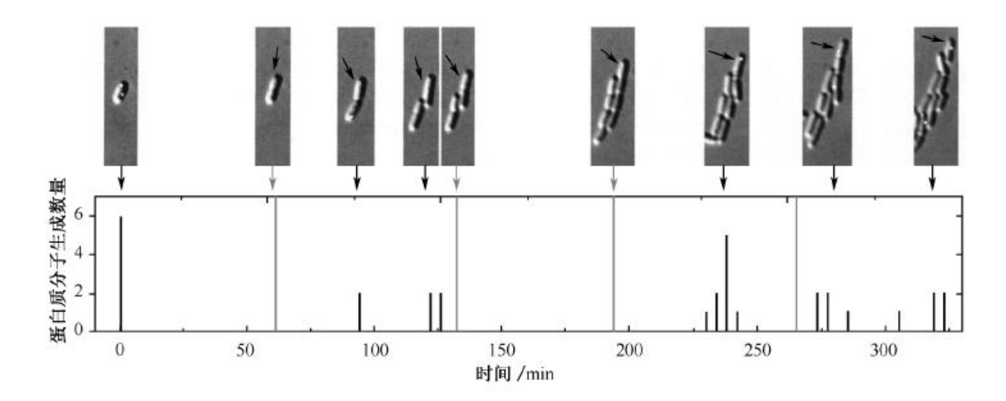



图 7-5　从缩时电影中获得的时间轨迹图。上面部分是 DIC 图像和荧光图像的重叠图。每个黄色的点是单个的荧光蛋白分子。图中黑色的箭头显示的是被获取时间轨迹的细胞。图底部黑色的箭头所指的是在时间轨迹的那个时间点上所产生的蛋白质分子的数量。图底部灰色的箭头所指的是细胞分裂的时间（时间轨迹上的灰线）。

## 监控转录因子与 DNA 之间特异结合

在这个部分我们将通过转录因子与染色体 DNA 间的特异结合的案例（Elf et al. 2007）来讨论如何利用第二种束缚策略进行单分子水平上的检测。只有当细胞内荧光标记的 DNA 结合蛋白分子总数小于 20 的时候，我们才能从它们运动能力的差异上分辨自由扩散、非特异性结合和特异性结合的蛋白质。DNA 特异性结合蛋白在 1 s 的曝光时间会停留在相同的位置，这让它可以更清晰地从细胞自发荧光的背景中检测出来（图 7-6）。这种可以分辨结合和非结合蛋白的方法使得我们可以在高时间分辨率下直接通过改变细胞的生长环境来研究活细胞中单个 DNA 结合蛋白的动力学。用于研究 DNA 结合蛋白的具体方法和分析手段与用膜定位报告子来研究基因表达的方法相似，仅在一些细节上做了修改。

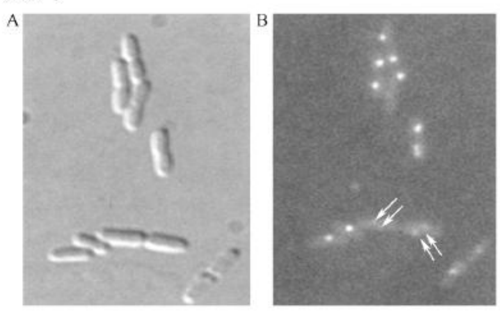



图 7-6　A. 大肠杆菌的 DIC 图像；B. 图上的点是带标记的转录因子 MalI 与其在染色体上的单一结合位点相结合地方。箭头所指的结合位点可能是由于复制造成的。

1. 融合荧光蛋白应该克隆到受到严格调控的低拷贝的质粒中来表达。只有每个细胞中的融合荧光蛋白的数量保持在一个较低的水平（每个细胞少于 20 个拷贝），我们才可以分辨结合的蛋白质和自由的蛋白质。如果我们感兴趣的转录因子原先的表达水平已经足够低了，那么我们建议融合蛋白在原位点进行表达，因为这样得到的结果更接近于细胞群体的平均表达水平。

2. 和基因表达分析相比这里不需要光漂白这一步。光漂白的发生反而会对改变生长条件前后的荧光检测带来一些不必要的麻烦。因为荧光蛋白成熟时间的长短已经不是关键，所以成熟时间相对较长但荧光基团更加稳定的荧光蛋白更占优势，如黄色荧光蛋白（EYFP）。如果荧光蛋白成熟缓慢，那么融合蛋白的表达必须受到严格的调控在进行显微镜实验之前几代应该关闭融合蛋白的表达，只有这样荧光基团才有足够的时间来成熟，同时结合位点不会被无荧光蛋白所占据。

3. 在所有的牵涉到融合荧光蛋白的实验，都应该确定融合后的蛋白质是否依旧具有和野生型蛋白相同的活性。在研究中必须根据蛋白质的特性选择一个合适的活性分析方法。例如，假设 DNA 结合蛋白是一种转录因子，那么，针对其调控性能进行蛋白质活性检测是最佳的选择。在抑制和激活的两种情况下对它所调控的基因的表达水平进行分析。

4. 有两个方法可以确定在改变生长条件之后转录因子和染色体上特异结合位点之间结合和解离的速度。一种方法是数出生长条件改变前每个细胞中被结合的操纵子的数量，再数出生长条件改变后一系列时间点上的每个细胞中被结合的操纵子的数量。因为用这种方法时视野不能改变，所以要特别注意矫正在未改变生长条件时由于光漂白所造成的改变。另一种可供选择的方法是比较一群细胞在生长条件改变前细胞中被结合的操纵子的平均数量和生长条件改变后一系列时间点上被结合的操纵子的平均数量。用这种方法的时候视野是可以改变的，所以不用考虑光漂白带来的问题。如果结合和解离在动力学上较快，那么就要确保更换培养液和获取图像之间的配合更加快速精密。这可以通过将电脑控制的蠕动泵（Harvard Apparatus PHD200）与图像获取软件相同步来实现（如 LabView 和 National instrument）。

## 对自由扩散的荧光分子和转录因子非特异性结合的监控

理论上通过约束法来进行单分子水平的研究还可以进一步延伸。通过缩短激光的曝光时间，甚至可以检测得到胞质内单个做自由扩散的荧光蛋白。图 7-7A 就是利用相似原理的一个例子。利用一个极短的曝光而得到一张非常清晰的子弹穿过苹果的照片。我们利用强激光进行短暂曝光（0.3 ms），在这么短的时间里蛋白还来不及扩散到衍射斑外。图 7-7B、C 是在大肠杆菌的胞质中检测到的高信噪比的单个红色荧光蛋白（tdTomato）信号。因为这种方法同时具有分子计数的能力，所以可直接用于检测细胞内表达水平较低的蛋白质的浓度而不需要校准。

通过缩短曝光时间可以检测到与相对固定目标（如染色体 DNA）进行短暂结合的分子。只要曝光时间与其结合时间相当，就可以使分子停留住。用这种方法已经得到单个转录因子 LacI 非特异结合到染色体 DNA 的图像（图 7-8）（Elf et al. 2007）。通过将激发激光快门的速率与 CCD 的帧率同步，在频闪照明条件下可以得到单个蛋白质分子的运动轨迹（图 7-9）。通过这个方法使得我们可以在活体条件下研究单个蛋白质分子

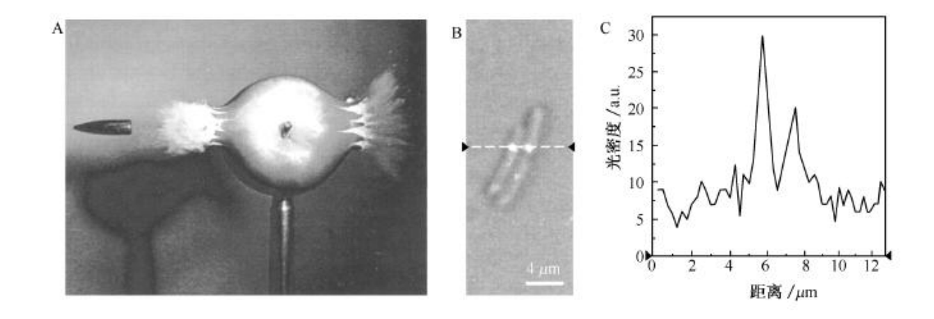



图 7-7　A. 通过闪频摄影得到的子弹穿过苹果的照片（Harold and Esther Edgerton Foundation，2006，courtesy of Palm Press，Inc）。B. 三个大肠杆菌细胞 DIC 图像和荧光图像的重叠图，其中有两个细胞在胞质中各带有一个 tdTomato 分子。这张荧光图像是利用强度为 50 kW/cm$^2$ 的激光激发，在 300 μs 的曝光后获得的。C. 在检测图 B 横截线上的荧光信号上时观察到的两个清晰的峰应该是由胞质中的两个独立的 tdTomato 分子造成。(已修改，得到了 Xie 等 2006［© AAAS］的准许)

的扩散运动。样品制备与前面部分的方法相似。只是在显微镜的设置和数据分析处理上有些许改动。

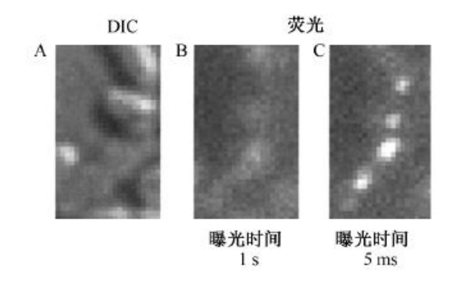



图 7-8　在不同曝光时间下 lac 抑制子非特异性结合的图像。A. 为细胞的 DIC 图像；B. 曝光时间为 1 s 时得到的荧光图像；C. 曝光时间为 5 ms 时得到的荧光图像。在曝光时间为 1 s 时得到的图像中每个 LacI 分子呈现的都是一个扩散的荧光背景。而在相同的激发能量下曝光时间为 5 ms 时得到的图像中，可以清楚地观察到它们所形成的衍射斑。

1. 频闪照明的关键是具备能够产生足够短的激光脉冲的能力。一般的快门其最大速率只能达到 100 Hz（Uniblitz，Newport），而非结合的过程则更快，如 LacI 在 1～5 ms。在这里用声光调制器（acousto-optic modulator，AOM）来对脉冲进行调节才是最佳的选择。声光调制器设置在激光束前面，当接收到一个合适的电信号（如触发信号）的时候，它可以将光束转向到一个设定好的方向。将 CCD 的曝光信号输送到数字延时发生器中通过触发信号使激光脉冲与 CCD 的帧率同步（在我们的设置中是通过 LabView 程序来设置触发 AOM 的延时时间和脉冲宽度）。所以可以确保在获取每张图像的时候只发出一次激光脉冲。因为脉冲很短，所以为了确保可以激发出光子就需要提高激发激光的能量。在对 tdTomato 的激发中我们使用了 568 nm 的激光（Coherent Innova Sabre）并

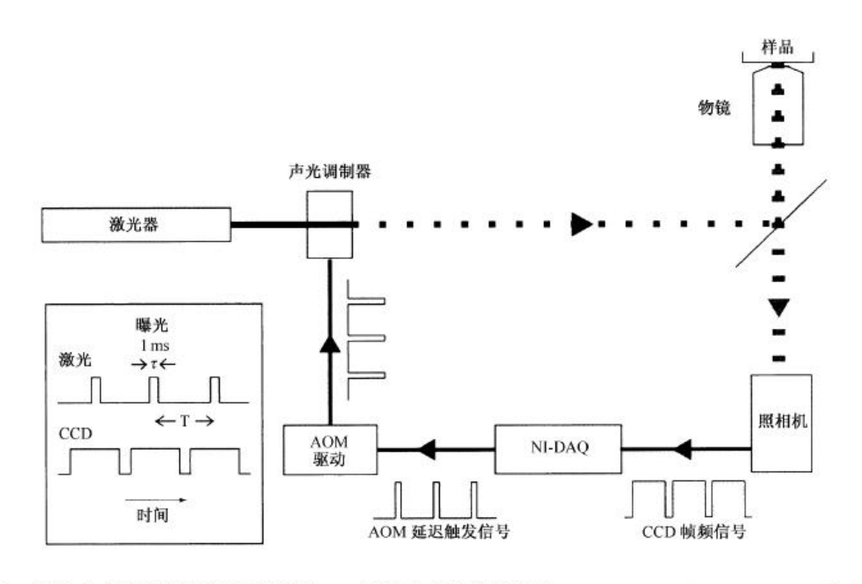



图 7-9　试验中闪频照明的设置示意图。一台装备有数据收集卡（from national instrument）的电脑接收从 CCD 照相机发出的获取每帧图像的曝光信号，并产生一个宽 1 ms 的 5 ms 延时脉冲（触发信号），用以触发声光调制器（AOM）。而声光调制器将作为快门制造出持续时间为 1 ms 的同步激光脉冲。（插入）激光脉冲和触发信号的时序图。

配合气体激光器。对于其他的荧光蛋白而言，在激光系统中需要使用相似的能源。

2. 在获取足够数量的图像后，利用二维高斯函数可以计算出每个荧光斑所对应的分子的位置及其质心位置（Van Oijen et al. 1998）。通过 1 ms 的曝光，在 Venus（YFP）发出 100 个荧光光子，像素尺寸为 $e^{-1}$＝167 nm，背景噪声约 7 个光子的情况下其空间位置的精度可以达到 50 nm。如果曝光时间延长，有可能可以得到更加精确的空间定位，因为较低的激光能量只能诱导出较少的荧光光子。我们可以通过自行编写软件或人工将图像上面的荧光斑联系起来而获得单个蛋白质的时间轨迹。值得注意的是要避免选择那些因为两个轨迹靠得太近而导致无法区分的分子。

## 总结

本章讨论了利用空间束缚的手段在单分子水平上对基因表达和转录因子介导的基因调控进行实时研究的方法。这些方法为基因活动的研究开辟了一个新天地。这些方法不仅可以阐明基因调节网络上的动力学特性，还可以对基因调节的量化模型进行检测。当荧光报告子具有较高的光稳定性和更易控制的光化学性质成为可能，不仅可以实现基因表达成像在单分子水平上的多层次的研究，也可以使不同基因间的相互作用变得更为直观。另外虽然真核细胞较原核细胞具有更大的体积和更强的自发荧光背景，但酵母和哺乳细胞在单分子水平的检测原理和原核细胞是一样的。这也为真核细胞在单分子水平的基因表达实时检测提供了可能。

# 实验方案 1：清洗盖玻片

该实验方案介绍了清洗用于细胞生长并进行单分子水平成像的盖玻片的方法。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

试剂

丙酮＜!＞
乙醇（95%）
氢氧化钾（KOH；1 mol/L）＜!＞

设备

陶瓷支架
盖玻片
玻璃广口瓶
镊子
超声波清洗仪
使用时请戴上耳塞并且提醒实验室其他人员注意防护。

## 方法

1. 将盖玻片垂直置放于陶瓷支架上浸没在盛有 1 mol/L KOH 的玻璃广口瓶中。确保溶液浸没所有盖玻片，且各盖玻片之间是完全分离的。
2. 把广口瓶置于超声波清洗仪中使水面位于其下部 2/3 处，用大功率（约 80W）超声波清洗 20 min。
3. 用镊子小心地移动陶瓷支架，使之浸没于新的盛有水的玻璃广口瓶中。
   该步骤用于漂洗上一步残留的溶剂。每次将支架转移至一种不同的溶液中之前务必重复该步骤。
4. 将盖玻片支架从水中移入另一个盛有丙酮的广口瓶中。
5. 重复步骤 2。
6. 重复步骤 3。
7. 将盖玻片支架从水中移入另一个盛有 95%乙醇的广口瓶中。
8. 重复步骤 2。
9. 重复步骤 3。
10. 重复以上所有步骤 2 次以上。
11. 最后，将支架移至一个新的盛有水的广口瓶中（不是在每次转移之间用于漂洗的广口瓶），超声波清洗 20 min。
12. 把洗净的盖玻片放入一个新的盛有水的广口瓶，盖上盖子。
    洁净的盖玻片可以在这个盛有水的广口瓶中保存数周。

## 实验方案 2：为单分子研究制备样本

该实验方案介绍了如何制备细胞小室中的 *E. coli* 样品，用于后续的基因表达研究中的分子水平成像。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

琼脂糖（SeaPlaque，低熔点，Cambrex）

室温储存。

抗生素（适合用于细菌培养的）

生长在新鲜琼脂培养基上的 *E. coli*（<1 周）

水（消毒的，去离子水）

M9 基础培育基

5× M9 盐（200 ml）

1 mol/L $MgSO_4$（2 ml）< !>

20% 的碳水化合物溶液（如 20%葡萄糖）（20 ml）

1 mol/L $CaCl_2$（0.1 ml）< !>

消毒过的水（加至 980 ml）

分别制备 $MgSO_4$和 $CaCl_2$溶液，高温蒸汽消毒，用消毒过的水将 5× M9 盐稀释至 980 ml，并将溶液加入其中。用 0.22 μm 的过滤器过滤葡萄糖然后加入稀释后的 M9 盐溶液。本章中所有的 M9 基础培育基均补充了 1× MEM 氨基酸和维生素（Invitrogen）。

5× MEM 氨基酸溶液（Invitrogen）（−20℃保存）

5× MEM 维生素溶液（Invitrogen）（−20℃保存）

#### 设备

盖玻片（洁净的；置于支架上并保存在盛有去离子水的广口瓶内；按实验方案 1 中所述的准备）

橡胶垫圈（矩形的；1 mm 厚）

加热器事先设定 50℃和 70℃

小型带槽载玻片（灌流玻片）

小型离心机（台式）

小型离心管（1.5 ml）

物镜加热器（Bioptechs）

移液枪（200 μl）

移液枪枪头（1 ml，切掉末端 1 mm）

灌注型孵育池（Bioptechs FCS2）
刀片（可选择的，见步骤 7）
摇床事先设定为 37℃
分光光度计
棉纸
镊子（平头）
振荡器

## 方法

1. 按下述方法制备培养细胞。
   i. 在计划的显微实验前一晚，将目的 *E. coli* 从新鲜的琼脂培养基中（小于 1 周）接种至含有适当抗生素的 3 ml M9 基础培养基中，在摇床上 37℃培养过夜。
   ii. 第二天上午，再将过夜的培养基 1∶200 接种于 1 ml 的新鲜的含有适当抗生素的 M9 基础培养基，放回摇床培养。
   iii. 当培养细胞在 600 nm 的光密度达到 0.2 时（通常为接种后约 4 h），开始制备琼脂糖胶垫。
2. 按下述方法制备琼脂糖胶垫：
   i. 称量 10～30 mg 的低熔点琼脂糖放入 1.5 ml 的离心管；
   ii. 加入 M9 基础培养基使得终浓度为 3%（*m*/*V*）；
   iii. 轻轻振荡混合物，然后将其放置在加热器上 70℃加热 30 min。
3. 同时，按下述方法准备培养皿装置。
   i. 将一片带槽载玻片擦拭干净。把载玻片槽面朝上放在一张洁净的卫生纸上。
   ii. 把一片矩形的橡胶垫圈平放在载玻片的上方，使中间矩形的长轴开口方向与里面的小槽平行（见图 7-4）。
   这样的方向确保了灌注的通道被隐藏，整个池子能够保持一定的温度和压力。
   iii. 用一把平头镊子从盛有去离子水的广口瓶中的支架上取一块洁净的盖玻片。用去离子水清洗载玻片的两面，不要触碰盖玻片的中间部分。
   iv. 用一个通过管子与加压的空气相连的 1 ml 的枪头（末端 1 mm 被截去）吹干盖玻片。
   请勿将尖端枪头指向人，加压的空气有可能把管子上的枪头冲飞，造成严重的刺伤。
   v. 将干燥的盖玻片靠在步骤 3 中准备的部分培养皿装置边缘。
4. 继续制备琼脂糖胶垫（从步骤 2 开始）
   i. 检查溶解琼脂糖胶带小管，确保琼脂糖胶完全被溶解。轻轻敲击小管赶出里面的气泡。
   ii. 将加热器的温度调制 50℃。
   iii. 当小管在加热时，用 200 μl 的移液枪吸取 70 μl 琼脂糖胶，并迅速从密封垫中间的开口处加入 50 μl 到带槽的载玻片上。不要排出最后几微升的琼脂糖胶，因为这样有可能产生气泡。

iv. 立即用洁净干燥的盖玻片盖在琼脂糖液滴上。一旦盖玻片接触到液滴，就不要移动它。

盖玻片不一定要与密封垫对齐，但最好让它盖住整个密封垫的开口。

v. 让琼脂糖液滴静置 30 min。

熔化的琼脂糖胶可以在 50℃的加热器上加热 4 h。之后将其移出，因为过长时间的加热会使背景荧光增加。

5. 在琼脂糖静置的过程中，按步骤 3 的 iii～iv 制备另一块盖玻片。
6. 继续准备培养细胞。

i. 检查第二次接种的培养基确认它在 600 nm 的光密度下接近 0.4。

ii. 从摇床中取 1 ml 的第二次接种的培养基。在离心机上 400 r/min（1.5 *g*）离心 30 s。

iii. 小心地弃去上层清液，不要摇晃离心管。

iv. 加入 1 ml 新制的 M9 基础培养基，并轻柔地将菌体均匀打散。

v. 4000 r/min 离心 1 min。弃去上清液。

vi. 加入 1 ml 新制的 M9 基础培养基，并将菌体均匀打散。

vii. 转移 50 μl 均匀打散后的菌液到一个新的离心管中，加入 95 μl 新制的 M9 基础培养基。

这一步稀释是必要的，它使得细胞在显微镜载物台上生长时有最佳的细胞密度。

7. 当琼脂糖胶凝固了，小心地移去上面的盖玻片。立即在琼脂糖胶垫上加入 1 μl 细胞培养基。

如果多于 1 株菌株需要同时检测，可以用刀片将琼脂糖胶垫切成 6 块。将它们分开并分别接种 0.5 μl 不同的细胞培养物。

8. 室温下等待 3 min 让液体被琼脂糖胶垫充分吸收。

如果接种量和琼脂糖胶垫的大小有变化，等待的时间是可变的。

9. 小心地在琼脂糖胶垫上覆盖一片洁净干燥的盖玻片，确保盖玻片与下面的带槽载玻片和矩形密封垫对齐。一旦盖玻片接触到了琼脂糖胶垫不要移动它。如果确实没有对齐，从步骤 3 重新开始。
10. 将这个玻片“三明治”放在灌注池（FCS2）的顶上，使其金属夹朝上。按厂家提供的使用说明小心组装灌注池。
11. 按厂家说明书升高电子温度调节器。将温度调至 37℃。
12. 将组装好的池子放在显微镜的平台上。
13. 打开物镜加热器，将温度调至 35℃而不是 37℃，以保证物体的热血特性。

不要让物镜加热器使用过程中温度变化次数过多，因为这有可能导致物镜的镜片被损坏。应该让物镜加热器留在设定的恒温下或者在实验后将它放在一个与实验温度相似的加热容器中。

14. 等待 30 min 直至池子和物镜在实验方案 3 中成像之前温度平衡（见排疑解难）。

## 排疑解难

**问题**：细胞在胶垫和下面的盖玻片之间浮动。

［**步骤 14**］

**解决方法**：可能有两种原因。

1. 在制备在薄片的过程中，琼脂糖胶垫在空气中存放时间过长而导致部分琼脂糖胶干燥或收缩变形。这会导致琼脂糖胶垫与盖玻片之间存在间隙，导致细胞不能与盖玻片接触。减少琼脂糖胶垫在空气中存放的时间。
2. 接种的细胞培养物体积过大导致池子装配好之前液体培养物并没有完全被琼脂糖胶垫吸收。减少加入的培养物的体积并且适当调整制备的时间。

# 实验方案3：显微实验：拍摄缩时电影

该实验方案介绍了如何在单分子水平探测基因表达的研究中拍摄延时的影像。它概述了应用于不同显微成像系统和不同软件的各个重要步骤的基本原则。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

设备

电荷耦合装置（CCD）照相机（VersArray 1024，Roper Scientific Inc；带有深度的热电冷却技术，Princeton Instruments；或者Cascade 521B）
生长池（按照实验方案2中所述完全装配好的）
激光（Coherent Innova Sabre DBW10）< !>
倒置显微镜（Olympus IX71）
物镜（Olympus PlanApo 60×1.45 oil TIRFM）
物镜加热器（Bioptechs）
设置成像程序的软件

## 方法

1. 在实验前半小时打开激光和照相机，确保激光器发出的激光功率是稳定的。并且将照相机冷却到至少为−60℃。
2. 将组装好的生长池放置在载物台上，确保加热器在加热并且温度稳定。
3. 调整焦距和载物台位置找到一个好的成像区域。选取一个即将分裂的细胞（根据细胞长度判断），这样完整的细胞周期就能在实验开始后立即被观察到。在程序开始之前检查荧光成像确保荧光背景干净（见排疑解难）。

   一个好的成像区域应该没有细胞碎片和杂质，并且在照明区域中间只有一个健康的 *E. coli* 细胞。在一个区域中只有一个细胞确保了细胞周围有充足的空间和养分使得细胞能生长成为一个小菌落。
4. 保存 *z* 坐标位置，这样自动调焦系统能够根据坐标自动调整焦距找到原来的那一点。如果显微镜配备有机动化的 *xy* 载物台且成像软件可以控制这个载物台，那么多个区域可以被同时保存和成像。
5. 按照软件设定成像程序。下面是一个成像程序的例子。
   i. 将载物台移至保存的位置。
   ii. 播映光亮区域的成像背景。
   iii. 调至焦距（通过自动调焦）。
   iv. 保存现在的位置，覆盖原来保存的位置。
   v. 保存光亮区域的成像。

vi. 播映荧光成像。

vii. 保存荧光成像。

viii. 再一次打开荧光快门漂白荧光团。

6. 自定义时间间隔使这个成像程序循环执行，这样保证了细胞表达的连续调控。
设定具体的成像参数（如激光照射的吸收时间和连贯成像体系的间隔时间）来保证最佳的荧光激发，最大限度地收集发射的光子，并对细胞造成最小的伤害。在这里描述的特有的成像系统和激发功率下，最好设定吸收时间为 100 ms，时间间隔为 3 min。

## 排疑解难

**问题**：细胞的自发荧光太强烈。

［**步骤 3**］

**解决方法**：细胞的自发荧光背景主要来自黄素蛋白（Benson et al. 1979；Harms et al. 2001a）。

1. 在 Harm 等（2001a）中讨论了很多方法，利用显微镜的设置来减少自发荧光背景。
2. 一个简单的方法是将细胞培养于添加了新鲜的维生素和氨基酸的 M9 基础培养基。含有维生素和氨基酸的旧的 M9 基础培养基容易使细胞有更高的自发荧光背景。
3. 如果细胞处于不动的生长状态或者在压力下，自发荧光背景会大幅度提高。通过不断地分开，维持细胞处于健康的生长状态。这对于减少自发荧光背景很重要。

**问题**：荧光背景很强烈。

［**步骤 3**］

**解决方法**：通常，以下的三种处理方法对减少荧光背景有显著的帮助。

1. 用无水异丙醇小心地清洗载物台并使用低荧光浸渍的油。
2. 进行丙酮-乙醇-1 mol/L KOH 超声循环来彻底清洗盖玻片。
3. 用新鲜的基础培养基配置琼脂糖胶垫。

**问题**：细胞在显微镜载物台上不生长。

［**步骤 6**］

**解决方法**：很多因素造成了细胞在显微镜载物台上的缓慢生长。

1. 其中，激光激发造成的光损伤是最主要的。减小激光的功率，缩短暴露在激光中的时间，并使用一个更长的两个吸收的时间间隔来减少光损害。
2. 细胞在显微实验中的最适宜的时间是另外一个重要的因素。用一块新鲜的琼脂糖培养基再接种过夜的培养物。并且在第二天取对数期的细胞培养物用来显微实验。
3. 不要在琼脂糖胶垫中加抗生素，因为抗生素会使细胞紧张。
4. 确保组装好的生长池是不透气的，这样池子不会在实验过程中干掉。

5. 在 37℃下更多的细胞易于细胞紧张。任何情况下保持生长池和载物台的温度为 37℃。

**问题**：细胞不停地从成像区域中心移走。

［**步骤 6**］

**解决方法**：造成视野边缘细胞的漂动的原因是琼脂糖胶垫和盖玻片的相对移动，或者是载物台的机械上的不稳定。漂移的速度一般小于 200 nm/min。这对少于 1 h 的实验并不会造成太大的困难，但对于长时间的实验则必须纠正。

1. 并没有很简单的方法使得细胞不再漂移。但要确保液体培养物被琼脂糖胶垫完全吸收，并与环境充分平衡。
2. 如果载物台能够被电脑程序控制，估算出细胞漂移的速度及方向并自动向反方向以相同速度移动来抵消细胞的漂移。
3. 如果载物台不能够被电脑程序控制，间歇地检查成像区域，并手动调整载物台来解决细胞的漂移。

## 参考文献


Benson R.C., Meyer R.A., Zaruba M.E., and McKhann G.M. 1979. Cellular autofluorescence—Is it due to flavins? *J. Histochem. Cytochem.* **27:** 44–48.

Berg O.G. 1978. A model for the statistical fluctuations of protein numbers in a microbial population. *J. Theor. Biol.* **71:** 587–603.

Chubb J.R., Trcek T., Shenoy S.M., and Singer R.H. 2006. Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Curr. Biol.* **16:** 1018–1025.

Elf J., Li G.-W., and Xie X.S. 2007. Probing transcription factors dynamics at the single molecule level in a living cell. *Science* **316:** 1191–1194.

Golding I., Paulsson J., Zawilski S.M., and Cox E.C. 2005. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell* **123:** 1025–1036.

Guptasarma P. 1995. Does replication-induced transcription regulate synthesis of the myriad low copy number proteins of *Escherichia coli*? *BioEssays* **17:** 987–997.

Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H., Blab G.A., and Schmidt T. 2001a. Autofluorescent proteins in single-molecule research: Applications to live cell imaging microscopy. *Biophys. J.* **80:** 2396–2408.

Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H., Blab G.A., Kahr H., Gamsjager R., Spaink H.P., Soldatov N.M., Romanin C., and Schmidt T. 2001b. Single-molecule imaging of l-type $Ca^{2+}$ channels in live cells. *Biophys. J.* **81:** 2639–2646.

Harpur A.G., Wouters F.S., and Bastiaens P.I. 2001. Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells. *Nat. Biotechnol.* **19:** 167–169.

Lommerse P.H., Blab G.A., Cognet L., Harms G.S., Snaar-Jagalska B.E., Spaink H.P., and Schmidt T. 2004. Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophys. J.* **86:** 609–616.

McAdams H.H. and Arkin A. 1999. It's a noisy business! Genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends Genet.* **15:** 65–69.

Miyawaki A., Nagai T., and Mizuno H. 2003. Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7:** 557–562.

Mowbray S.L. and Sandgren M.O. 1998. Chemotaxis receptors: A progress report on structure and function. *J. Struct. Biol.* **124:** 257–275.

Nagai T., Ibata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K., and Miyawaki A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20:** 87–90.

Paulsson J. 2004. Summing up the noise in gene networks. *Nature* **427:** 415–418.

Shaner N.C., Steinbach P.A., and Tsien R.Y. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2:** 905–909.

Tsien R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67:** 509–544.

van Oijen A.M., Köhler J., Schmidt J., Müller M., and Brakenhoff G.J. 1998. 3-Dimensional super-resolution by spectrally selective imaging. *Chem. Phys. Lett.* **292:** 183–187.

Watanabe N. and Mitchison T.J. 2002. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* **295:** 1083–1086.

Xie X.S., Yu J., and Yang W.Y. 2006. Living cells as test tubes. *Science* **312:** 228–230.

Yu J., Xiao J., Ren X., Lao K., and Xie X.S. 2006. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science* **311:** 1600–1603.


（严颖刚　姚　里　译）

# 第8章　活细胞内单个病毒的示踪

**Michael J. Rust**[*,†]　**Melike Lakadamyali**[*,†]
**Boerries Brandenburg**[‡,§]　**Xiaowei Zhuang**[†,‡,§]

[†]Department of Physics, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138;
[‡]Howard Hughes Medical Institute, Cambridge, Massachusetts 02138; [§]Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138
[*]两位作者贡献均等

## 摘要

实时、活细胞成像技术和对单个颗粒追踪的算法能够被用来对感染细胞的单个病毒颗粒进行追踪。本章描述了用荧光标记病毒和细胞结构以实现在活细胞中对它们可视化的过程，还讨论了如何成像和分析病毒的运行轨迹以及病毒与细胞间的相互作用，实时成像的方法以及用来研究细胞机制在病毒感染时所扮演的角色的抑制物和试剂也在本章被阐述。这一章节还包括了追踪病毒颗粒和定量检测病毒转运、病毒与细胞间的相互作用的算法。本章最后还阐述了这些技术的运用实例和一系列的操作步骤。

## 概述

病毒是一种专门利用细胞自身机制来进行感染的病原体。以病毒颗粒（或病毒组分）与细胞结构的动态相互作用为特点（图8-1），病毒感染是一个包括很多步骤的复杂过程。实时、活细胞成像技术和对单个颗粒进行追踪的算法使许多研究成为可能，包括追踪单个病毒颗粒的路径、研究病毒和细胞机制之间的动态相互作用，以及把感染过程分解为几个基本的步骤以便阐明每个步骤的分子机制。这些方法不仅有助于我们理解病毒的感染机制，而且还有助于阐明细胞生物学中的一些基本问题（Brandenbrug and Zhuang 2007）。具体地说，对单个病毒的追踪实验可以阐明病毒进胞的内化路径（Pelkmans et al. 2001，2002；Rust et al. 2004；Ewers et al. 2005；Lehmann et al. 2005；Brandenburg et al. 2007）、病毒在细胞内转运和分拣的动态过程（Suomalainen et al. 1999；Dohner et al. 2002；McDonald et al. 2002；Lakadamyali et al. 2003，2006；Vonderheit and Helenius 2005）和病毒出胞的机制（Cudmore et al. 1995；Hollinshead et al. 2001；Rietdorf et al. 2001；Ward and Moss 2001；Newsome et al. 2004）。

本章描述了如何用荧光标记病毒和细胞结构来实现在活细胞中的可视化过程以及如何对病毒的运行轨迹以及病毒与细胞间的相互作用进行成像和分析。用于实时成像实验的仪器和方法，以及用于研究细胞机制在病毒感染时所扮演角色的抑制物和试剂也在本章得到阐述。本章还讨论了追踪病毒颗粒和定量检测病毒转运、病毒与细胞间的相互作用的算法。本章还列举了一个在活细胞中追踪流感病毒的技术的运用实例。本章最后以

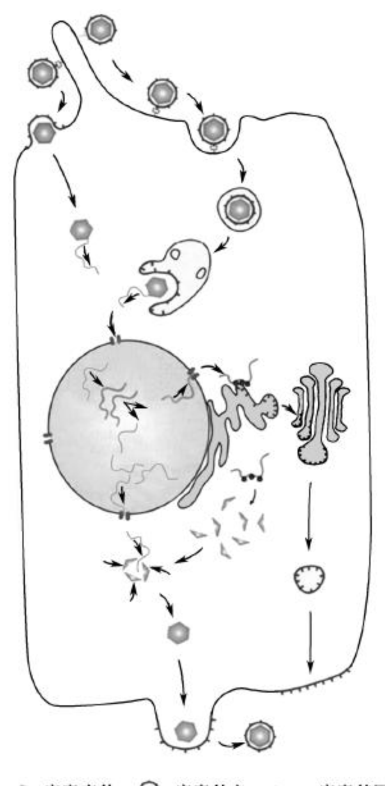



图 8-1　包装好的病毒的生活史。病毒感染开始于与细胞表面的黏附因子或特异的受体结合。大多数病毒在通过被动或主动转运进入合适的细胞器后会往细胞里释放其基因组。对于一些病毒来说，紧接着的是基因组入核。然后基因组得到扩增，病毒基因被表达。壳体蛋白在新合成的病毒基因组边上聚集。同时病毒外衣蛋白转运到质膜上。新合成的病毒颗粒从细胞出芽。

一些操作步骤结尾，包括标记病毒外衣和壳体蛋白、瞬转细胞以表达荧光蛋白、单个病毒颗粒的追踪。

## 病毒和细胞的标记

为了有效地标记病毒样本以获得低非病毒结构背景的成像，首先要获得纯化和浓缩的病毒原料。不同类型病毒的生长、分离和纯化步骤都不同。病毒原料能通过感染大量的培养细胞或让病毒在鸡蛋或活体动物中生长而产生。纯化一般包括通过密度梯度（如蔗糖和氯化铯）超速离心的沉淀和浓缩步骤。一些病毒现在可以以纯化好的方式从如 Charles River Laboratories 或 Virapur 等购买得到。

### 用亲脂性的染料标记包装好的病毒

亲脂性的染料能够被用来标记包装好的病毒的脂质双层膜（参见实验方案 1）。不同发射和吸收波长的亲脂性的染料现在有商业化提供（如来自 Invitrogen 的 DiD、DiI、DiO 和 Rhodamine-18）。因为细胞倾向于在可见光谱的蓝色端有明显的自发荧光，所以常常希望使用有深红色荧光发射光谱的标记，如 DiD（激发波长 644 nm/发射波长

665 nm)。DiD 能够以固体的形式买到，然后按所需的浓度溶解于二甲亚砜（DMSO）中。为了避免毒性作用，在标记的时候，标记溶液中 DMSO 的终浓度不应该超过 1%。

把病毒和染料溶液在室温混合后轻轻摇晃 2 h 就可以得到成功标记。包装好的病毒的膜融合能够用荧光反淬灭的方法来检测。假如病毒颗粒开始用足够高密度的染料标记，而且这些染料一直待在病毒膜中时，它们的荧光强度将会部分被淬灭。但一旦发生膜的融合，这些染料能够扩散到更大区域的细胞膜组分（如晚期内体的膜），导致荧光强度的相对增加（Stegmann et al. 1987；Loyter et al. 1988；Lakadamyali et al. 2003）。

不同种类的病毒产生所期望的淬灭程度所需要的最佳染料浓度是不同的。对于在酸性环境下发生融合的病毒来说，一个简单的鉴定实验可以用来确定标记的条件和融合的活性。病毒颗粒能够被所选择的不同浓度的亲脂性示踪剂所标记。融合所带来的荧光强度的大量提高的条件能够用红细胞（RBC）检测法来检测。病毒颗粒在摩尔过量的条件下首先与裂解的红细胞结合。这个混合物在 37℃孵浴的条件下被分装到两个超速离心管。少量的酸性缓冲液 [如 5%的 0.5 mol/L 的 2-吗啉乙磺酸（MES），pH 5] 加到其中的一只管子里，使其中溶液的 pH 达到 5.0，以便使病毒颗粒与红细胞血影蛋白融合。相同量的 HEPES145 缓冲液（pH 7.3）也加到另外一个管子中以使两管溶液的浓度相同。不同标记条件下融合前后的荧光强度能用荧光计来测量。带来强度很大差别的条件可以用来做追踪实验。还有一种方法就是病毒颗粒能被去污剂裂解而导致反淬灭效应。裂解前后的荧光强度也可以用荧光计来测量。

## 标记病毒外衣或壳体蛋白

实现病毒可视化的第二种方法就是直接标记在包装好病毒外衣或未包装好病毒壳体上的蛋白质。可以提供标记的病毒蛋白能够被氨基端染料标记（如 GE Healthcare 公司的 Cy-dyes；invitrogen 公司的 Alexa Fluordyes）。这些染料不仅明亮和可靠，它们中的一些还是 pH 敏感的。许多病毒要依靠内化细胞器中的酸性环境来引起病毒的融合和接下来的释放病毒基因组到细胞中的过程。为了检测病毒颗粒所处的局部 pH 环境，pH 敏感的氨基端染料（如 GE Healthcare 公司的 CypHer 5）能够被用来标记病毒外衣蛋白。pH 敏感的染料的 pKa 应该与被检测的 pH 范围相匹配。一般来说，这些染料的 pH 依赖的反应能够用比例检测法精确的检测。比例检测法就是如在跨膜蛋白上标记 pH 敏感（如 CypHer 5）和 pH 不敏感（如 GE Healthcare 公司的 Cy3）染料的混合物，它们有不同的发射波长（Lakadamyali et al. 2003）。被标记的病毒对不同 pH 水平的反应（如 CypHer5 与 Cy3 发射强度的比例）能够用感染实验前已知 pH 的缓冲液来校准。

除了来检测当病毒在细胞中转运时局部 pH 外，pH 敏感的染料标记策略还可以用来检测病毒是否进入了细胞。当标记有 pH 敏感染料的病毒感染时，细胞可以在不同时间点分别用高 pH 的溶液处理。因为活的细胞有能力缓冲其内部的 pH，只有在细胞外的病毒才会对胞外 pH 的改变敏感。病毒荧光强度对胞外 pH 改变的反应可以用来判断一个病毒是依然结合在细胞表面还是已经内化了。其他的病毒标记方法也被使用，如图 8-2 中的总结。

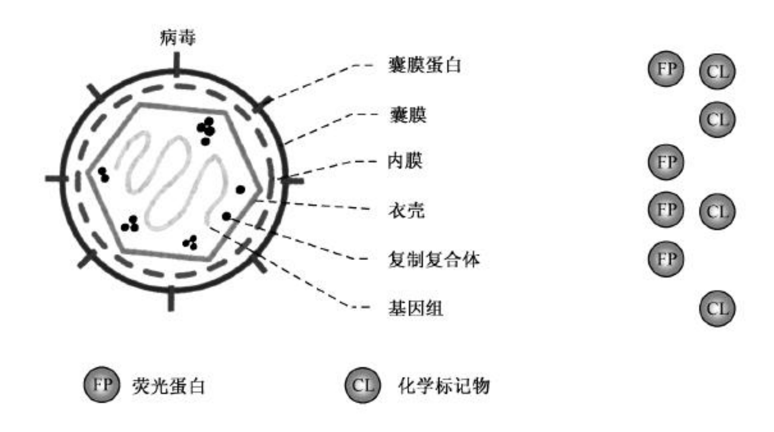



图 8-2　各种各样的标记病毒的方法。病毒的不同组分可以用化学标记物（如荧光染料分子）或通过遗传学方法与荧光蛋白融合来标记。(引自 Brandenburg and Zhuang 2007)

## 用绿色荧光蛋白变体标记细胞结构

许多细胞结构可以用遗传学编码的荧光蛋白（如用绿色荧光蛋白）及其变体来标记。各种荧光蛋白的构建体可以从一些厂商来获得（如 Invitrogen 和 MBL International)。荧光蛋白的种类最近发展到色彩范围更大、更亮、光学稳定性更好的水平 (Chudakov et al. 2005；Shaner et al. 2005)。而且，pH 敏感和可光学转换的荧光蛋白也被开发出来了（Lukyanov et al. 2005；Giepmans et al. 2006)。荧光蛋白和感兴趣的蛋白质基因的融合体能够被引入细胞以得到瞬时或稳定的表达。瞬时转染更快更容易，但会导致荧光标记的蛋白质大量的表达。荧光蛋白的过表达可能会破坏细胞的正常功能。在做成像实验之前，需要检测这样的副作用。有时希望产生能够有正常表达的稳定细胞株。稳定转染后，有低表达但可视见水平表达的细胞克隆能够被选择出来。对转染步骤详细的描述可以在以前出版的冷泉港实验室手册中找到（Lippincott-Schwartz and Snapp 2005)。实验方案 3 提供了瞬时转染细胞的方法。

为了产生稳定表达的细胞系，逆转录病毒能够被用来引导感兴趣的基因进入细胞。在这种情况下，荧光融合蛋白先被克隆入有安全性保证的逆转录病毒载体中（如 Imgenex)。然后用这个逆转录病毒载体转染 293T 细胞来获得包含荧光蛋白融合基因的复制缺陷型病毒。重组的逆转录病毒能用来感染目的细胞并把荧光蛋白融合基因整合入细胞基因组。然后负选择压力（如 G148）加入细胞培养液，表达所需水平荧光蛋白的细胞克隆能被选择和培养（Pear et al. 1993；Naviaux et al. 1996)。

## 在活细胞中对单个病毒成像的仪器使用

落射、共聚焦和全内反射荧光显微镜（Stephens and Allan 2003）已经被用来实时地观察单个的病毒和细胞结构。在落射荧光显微镜下，一束校准的光照亮了样品上一个

相对较大的区域（约 100 μm×100 μm）（图 8-3）。虽然落射荧光显微镜构造简单、易于获得信号，但是这种成像模式有很大的来自焦距外部分的荧光背景，从而使焦距中的细节部分变得模糊了。所以通常用扁平形态的细胞来做这个实验来减少在宽场、落射荧光模式中所带来的这些问题。

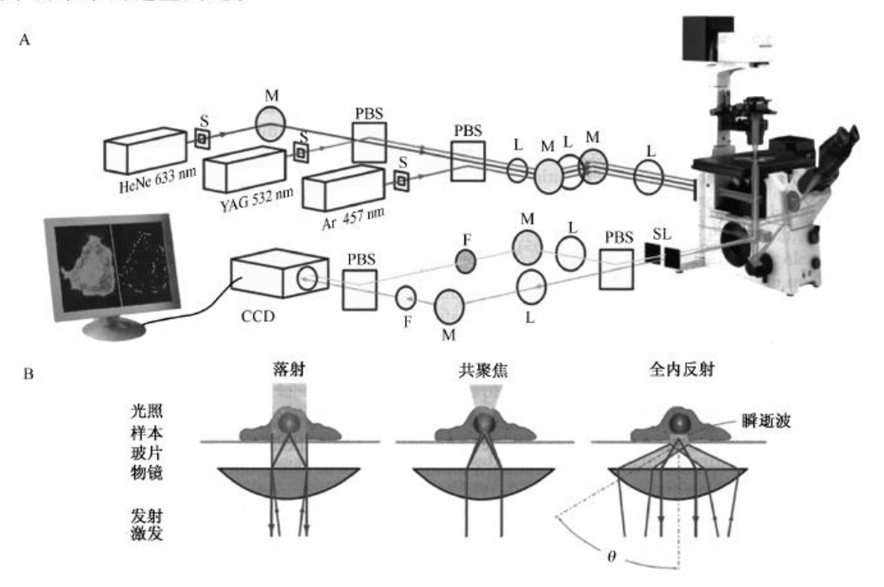



图 8-3　用来做单个病毒追踪的仪器。A. 用来做单个病毒追踪实验的典型的多色荧光显微镜的配置。不同的激光可以用来作为激发不同荧光团的光源，如氩离子（457 nm、488 nm、514 nm）、氪离子（531 nm、568 nm、647 nm）、氦氖（HeNe、543 nm、594 nm、633 nm）和钕：钇铝石榴石（532 nm）激光。（S）快门；（M）反射镜；（PBS）多色性分光镜；（SL）控制成像尺寸的光学狭缝；（CCD）电荷耦合器件摄像机；（L）棱镜；（F）滤镜。B. 常用的三种成像模式（落射、共聚焦和全内反射）。在落射成像模式中，一束校准的光照亮了一个大的样本区域。来自样本的发射荧光被一个高数值孔径目镜收集并被一个电荷耦合器件摄像机检测。这种模式容易被建立并可以提供低信号丢失的快速的宽场检测。但这种模式的荧光背景的排除率相对较低。共聚焦显微镜使用聚集的光束和空间过滤技术（在激发和检测路径上的针孔）来排除焦距外的背景荧光并获得高信噪比的图像，但是以信号的丢失为代价的。当把对样本的 $z$ 轴扫描考虑进去，三维的图像能够被建立。全内反射显微镜则是利用全内反射来产生一个逐渐消失的视场，这个视场仅仅可以深入样本几百纳米。这种宽场成像模式最能排除背景信号，但是仅仅能够被用来检测发生在细胞黏附表面的事件。（引自 Brandenburg and Zhuang 2007）

激光共聚焦显微镜使用空间过滤技术（在光源和检测器前的针孔）来排除焦距外的光线并明显地降低背景（图 8-3），但会以信号减弱为代价（Amos and White 2003）。传统的共聚焦显微镜用反光镜来控制在焦平面 $x$ 和 $y$ 轴的激光束从而来扫描图像。对于活细胞成像和观察快速移动到物体，以相对快的成像速度为特点的旋转磁盘共聚焦显微镜就再适合不过了。旋转磁盘共聚焦显微镜包括在磁盘上一系列盘旋状的针孔，这个磁盘位于一系列的物镜成像平面上，这一系列的物镜也位于一个磁盘上。所以，激发光被分成上千束以每秒几百次的速度来同时扫描整个视野，从而有效地产生焦平面实时完

整的的图像。共聚焦显微镜还可以扫描样本的 $z$ 轴从而可以从三维（$x$、$y$ 和 $z$）的角度追踪颗粒（Arhel et al. 2006）。

全内反射荧光显微镜（TIRFM）被用来观察发生在分界面上的荧光（图 8-3）。当光线投射到两个具有不同折射系数的光学媒介的分界面上时（如玻片和活细胞），大于一个关键角度的光线将会发生全内反射，从而产生一个逐渐消失的光波。一般来说，逐渐消失的光波扩展到第二种媒介（如细胞）仅仅 100～200 nm。被逐渐消失的光波照射到的如此薄的样本能够被激发产生荧光（Axelrod 2001）。所以，全内反射荧光显微镜在排除细胞被激发范围之外的区域来的背景荧光方面是非常优秀的。这使得在黏附细胞表面附近的感兴趣的细胞结构能够被清晰地检测。

照亮

激光或汞光源可以用来照亮样本。激光更适合于弱的荧光样本或高的时间分辨率的实验，这些情况需要高的激发光强度。当使用单独的激光时，常常更容易独立地调节对不同荧光团的激发（图 8-3）。氦氖、氪或红色二极管激光适合于激活长波长的荧光团（如 DiD、Cy5 和 Alexa 647）。多线程的氩激光或 Nd：YAG 激光适合于激活短波长的荧光团[如 DiI、R18、Cy3、青绿和黄色荧光蛋白（CFP、GFP 和 YFP）]。相关的，Crystal lasers、JDS Uniphase、Melles Griot 和 Spectra Physics 是一些提供激光光源的公司。在一个典型的活细胞成像实验中，多色激发光通过一个数值孔径为 1.3～1.45 的 60×～100×的油性物镜投射到样本区域。相同的物镜也收集来自样本的荧光发射并引导至光学检测部分。

检测

为了同时对两种颜色进行检测，来自两种不同类型荧光团的发射光可以用二色性的反光镜（Chroma、Omega Optical）分成两条路径。例如，650 nm 长通透的二色性的反光镜可以把 DiD 的发射光同 YFP 或 GFP 的发射光分离开来。在成像的平面可以有一个狭缝以便成像的大小正好相当于 CCD 芯片的一半。然后通过这两条路径的光被棱镜和反光镜成像到 CCD 芯片的两个不同的部分（图 8-3）。每一种标记的荧光发射光可以通过在各自路径的高光学密度、窄带宽、长通透的发射滤镜同激光或其他荧光光源分离开来。用来检测普通荧光团的基本滤镜和为特殊用途而定制的滤镜可以由 Chroma、Semrock 或 Omega Opticals 等公司提供。用这种方法对荧光发射光进行光谱分离的商业系统可以由 Optical Insights 提供。如果不用商业提供的系统（如来自 Optical Insights 的四色单位）进行多色成像，有一种方法就是使用在其中一个检测通道的自动旋转滤镜齿轮。两种期望波长范围（如对于 CFP 和 YFP 的检测）的发射滤镜可以放在滤镜齿轮的相邻位置。通过协调滤镜齿轮与激光发射的关系，允许在同一个检测通道以交替的方式对两种颜色（如 CFP 和 YFP）进行检测，同时在另外一个通道对另一种颜色（如 DiD）进行持续性的检测。例如，当激发 CFP 的激光开着时，能通透 CFP 发射光但阻止激光的发射透镜应该在正确的位置上，反之也是。在成像后为了弯曲和覆盖不同的通道，使用荧光珠子作为校准样本的两种校准的图像是有必要的。例如，对 CFP、YFP 和 DiD 的成像，应该记录一种用 CFP 和 DiD 滤镜的校准图像（蓝色校准）和另一种用 YFP 和 DiD 滤镜的校准图像（绿色校准）。这些可以用来在红色通道进行绿、蓝

通道的成像以达到多色的成像效果（见数据分析）。

当选择 CCD 摄像机时，考虑信噪比、量子效率、帧速率等特点是非常重要的。Roper Scientific、Andor Technology 和 Hamamatsu 是提供优秀 CCD 的一些公司。对摄像机的选择依赖于特殊的用途。快速帧速率的摄像机对于要求高时间分辨率的实验是适合的，但要以高的阅读噪声为代价。电子倍增 CCD（EMCCD）可以不以降低信噪比为代价提供快速帧速率，但价格昂贵。为了减少噪声，在成像时放大摄像机通常要被冷却。我们使用 CoolSnap HQ（Roper Scientific）或 iXon885（Andor Technology）来追踪流感病毒。

### 温度控制

对样本（如细胞）的温度控制能够通过商业提供的加热平台（Warner Instruments）、灌注室（Bioscience Tools）或自制的零件来实现。在自制方面，我们使用黄铜平台、适配物镜的黄铜圈套和适配培养皿的中空的黄铜片来控制温度。所有的三种黄铜零件都有通过塑料管连接到水浴的水槽。通过黄铜的水循环维持样本的温度在某一不同于环境温度的水平。水浴的温度并不一定要同样本的温度相匹配。有一个温度偶联装置用来校准温度以保证样本处在一个所需的温度水平（一般哺乳动物细胞是 37℃）。

## 操作单个颗粒追踪实验

### 细胞

因为高数值孔径的物镜只有短的工作距离并不能对厚的底物进行成像，所以细胞必须生长在薄的载玻片上。有玻璃底的培养皿可以从 MatTek 公司买到或在培养皿底部钻一小孔并用环氧化物粘一块玻璃片而制作。为了增加皿的重量并减少实验中的漂移，我们发现在小皿底部粘贴大的黄铜洗器（McMaster-Carr）是有帮助的。黄铜洗器的内径必须足够用来清洗显微镜的物镜。

在培养条件下，培养液通常含有血清和酚红，两者都会导致成像时的高荧光背景。为了减少荧光背景，细胞必须在成像前在无血清和酚红的细胞培养液（Invitrogen、ATCC）中充分洗净。我们常常使用无血清和酚红的 MEM 或 DMEM，其中还会加 100 mmol/L的 HEPES（pH8.0）作为成像缓冲液。包含葡萄糖氧化酶和过氧化酶的酶氧化净化系统可以用来降低光漂白。

### 成像

实验方案 4 描述了如何利用一个或多个荧光标记来做病毒追踪实验。

### 小分子抑制物

在这一部分，描述了用来研究细胞吸收和转运机制的普通药物和方法。为了阐明有阻碍细胞功能的小分子抑制物的使用，我们选择细胞骨架依赖的转运为例子。细胞里面的主动转运常常通过分子马达来实现，如在微管上运动的 dynein 和 kinesin 或在肌动蛋白丝上运动的肌球蛋白（Radtke et al. 2006）。不同的药品可以用来特异的解聚微管或肌动蛋白网络，如诺考达唑（nocodazole）和细胞松弛素 D（cytochalasin D），见表 8-

1。对于许多哺乳动物细胞，如 HeLa、CHO 或 BS-C-1，这种解聚能够通过用足够量的小分子抑制物预处理（如 60 μmol/L 诺考达唑或 20 μmol/L 细胞松弛素 D 于 37℃时最少处理45 min）活细胞来实现。药品处理所需的剂量和时间需要通过对微管或肌动蛋白进行免疫荧光染色来证明，看是否破坏了细胞骨架网络。药品在整个实验中应该保持在成像溶液中以保证对细胞结构的持续破坏。表 8-1 列举了一些常用来抑制病毒进入细胞和在细胞中转运的药物。

**表 8-1　用作进入细胞和细胞转运实验的常用的小分子抑制物**

| 作用靶 | 抑制物 | 功能 |
|---|---|---|
| 细胞骨架 | Nocodazole | 解聚微管网络 |
| | Taxol | 稳定微管 |
| | Cytochalasins | 解聚肌动蛋白 |
| | Latrunculins | 解聚肌动蛋白 |
| | Wiskostatin | 阻碍肌动丝的聚集 |
| | Jasplakinolide | 稳定肌动蛋白 |
| | Mycalolide B | 抑制肌动蛋白聚合和肌动蛋白激活的肌球蛋白 $Mg^{2+}$-ATPase 活性 |
| | Wortmannin | 抑制肌球蛋白轻链激酶和磷脂酰-肌醇-3-羟基激酶活性 |
| | Butanedione | 抑制肌球蛋白 ATP 酶活性 |
| | Monooxime | |
| | Blebbistatin | 抑制肌球蛋白轻链 |
| 内体 | Bafilomycin | 抑制空泡样 proton-ATPase 活性（阻止内体酸性化） |
| | Ammonium chloride | 提高内体 pH |
| | Monodansylcadaverine | 影响内体 pH 的有溶酶体活性的复合物 |
| | Statins | 下调 Rho GTP 酶活性 |
| 网格蛋白 | Chlorpromazine | 抑制网格蛋白介导的内化（有副作用） |
| 动力蛋白 | Dynasore | 抑制动力蛋白的功能，这对网格蛋白和小窝蛋白介导的内化是重要的 |
| 胆固醇 | Filipin | 结合细胞膜中的胆固醇由此抑制小窝蛋白介导和其他脂伐介导的内化 |
| | Progesterone/Nystatin | 屏蔽细胞膜中的胆固醇由此抑制小窝蛋白介导和其他脂伐介导的内化 |
| | Methyl-β-cyclodextrin | 去除胆固醇（可能还有其他作用） |
| 三磷酸腺苷 | Sodium azide/Deoxyglucose | 去除细胞 ATP 以阻碍能量依赖的过程 |

许多药物，如氯丙嗪（chlorpromazine）和甲基-β-环糊精（methyl-β-cyclodextrin），对细胞功能有非特异的副作用，所以很难把观察到的作用与真正的病毒感染机制准确联系起来。除了使用药物外，还可以转染针对特异基因的小的干扰 RNA（siRNA）入细胞（Hannon 2003）。某一个细胞蛋白的表达能够被特异的 siRNA 所敲除。常用的 siRNA 的序列能够在文献中或 siRNA 生产商（如 Dharmacon、Charmacon 和 Illinois）的数据库中找到。为了达到显著的敲除效应（>80%），细胞常常需要被转染两次（终浓度为 5~10 nmol/L）。对目的基因的敲除效应应该用蛋白质印记、免疫荧光或功能检测来测试。为了排除因为转染所带来的副作用，用非特异的 siRNA 作为对照是有必要的。

## 对单个病毒追踪的分析方法

### 颗粒追踪

对颗粒追踪的算法的目标是把原始的一叠荧光图像转换为一系列的运行轨迹，这些

轨迹以每一个颗粒的荧光强度对时间的函数的坐标轴为特点。对这个问题的一些解决方法包括贝叶斯滤波方法（Arhel et al. 2006）和成本函数的优化（Sbalzarini and Koumoutsakos 2005）已经被用来对单个的病毒进行追踪。我们用一种简单的方法即使用对颗粒运动最少数量的先验假设。这个过程包括以下的4个步骤并会在接下来的部分详细阐述。

1. 在原始图像帧中鉴别出分离的荧光峰值。

2. 配对被鉴定出来的帧的峰值以便生成运动轨迹。

3. 把运动轨迹用图像的方法表现出来，以便人工的分辨出自动处理过程中的模糊和错误。

4. 分析运动轨迹以产生对感兴趣参数的统计值，如瞬时速度、平均平方位移和荧光强度对时间的函数。

**峰值的检测**

对于背景和实际实验条件下的噪声来说来自单个病毒颗粒的荧光信号常常很弱。因为背景和噪声能导致不真实的峰值检测，我们首先要用空间滤波器来处理每一帧的图像以去除噪声。图像一般被像素之间不相关的高频率的噪声（相当于CCD的阅读噪声）和低频率的噪声（相当于细胞和媒介的自发荧光）污染。为了辨别出图像中的一些有衍射或近衍射限制大小的小点（如单个病毒颗粒），我们用带有零平均的二维高斯空间滤波器来褶积图像。即

$$K_{xy} = \frac{1}{\sum_{i=-n}^{n}\sum_{j=-n}^{n} e^{(-i^2-j^2)/2\sigma^2}} e^{(-x^2-y^2)/2\sigma^2} - \frac{1}{(2n+1)^2}$$

式中，$\sigma$为高斯宽（选来相当于显微镜的点扩散功能的宽度）；$n$为能排除低频信号的滤波器的一半宽度。假如原始图像中像素点的强度用$F(x, y)$来表示，那么过滤图像中像素点的强度$G(x, y)$如下计算：

$$G(x,y) = \sum_{i=x-n}^{x+n}\sum_{j=y-n}^{y+n} F(i,j)K_{ij}$$

式中，核心$K$在之前已被界定。实际操作中我们用$n=4$，相当于约0.9 μm。

为了界定顶点相当于病毒颗粒的位置，我们扫描被过滤的图像以获得局部的最高点。虽然这些最高点的位置本身给出了对颗粒坐标轴的粗略估计，它们的粗略精度被像素点本身的特点限制住了（如芯片上像素点的有限大小）。一种更准确估计颗粒坐标的强大方法就是计算包含局部最高点的小区域的中心，这种方法允许可能的扭曲的顶点形状（这可由如运动模糊产生）。假如$G(x,y)$代表过滤的图像，$(x_0, y_0)$代表局部最高点的坐标，那么颗粒的强度$I$是这样计算的

$$I = \sum_{y_i=y_0-N}^{y_0+N}\sum_{x_i=x_0-N}^{x_0+N} G(x_i, y_i)$$

顶点的中心位置是这样计算的

$$[x,y] = \frac{1}{I}\sum_{y_i=y_0-N}^{y_0+N}\sum_{x_i=x_0-N}^{x_0+N} G(x_i, y_i)[x_i, y_i]$$

这个过程一般可以检测所有的病毒颗粒，但是也会得到一些因为噪声造成的不真实的顶

点。为了排除这些假顶点，我们设置了一个预值 $I_{min}$ 以排除 $I < I_{min}$ 的顶点。

**轨迹的生成**

在确定每一帧图像的颗粒坐标后，颗粒轨迹能够通过联系每帧图像间的颗粒来建立。病毒追踪实验的特性使这个过程变得复杂，因为颗粒的数量一般来说在每帧图像的数量是不一样的。这是因为颗粒的真实出现和消失以及检测单个病毒颗粒的可靠性所带来的挑战。样本中荧光数量的真正改变有可能是因为有新的病毒颗粒结合到细胞表面，没有内化的病毒颗粒脱离细胞或其他的原因。检测的问题通常可由以下的原因引起，病毒颗粒移入或移出焦平面或因为有限的信噪比，一些真正的病毒不能在某些帧中被检测，而一些不真实的颗粒被检测，其实它们是由于图像的随机波动而引起的。

为了应对这些挑战，一种颗粒追踪算法必须有能力让运动轨迹在运动的长度中开始和结束。因为对暗颗粒的检测是间断的，这种解析法也应该有能力忍受在一个病毒颗粒的轨迹中帧图像的偶尔丢失而不至于丢失整个轨迹。而且，为了在研究不同类型颗粒运动中不产生偏见，我们用了一种算法，它只依赖于前一帧的信息来延伸颗粒运动轨迹而不依赖于颗粒的运动历史。

解决这个问题的一个简单的方法就是界定一个优势函数，它描述了一帧图像上的颗粒同下一帧图像上假定的配对者之间的匹配程度。假如我们把一帧图像上的颗粒的位置和强度定义为 $[x_i, y_i, I_i]$，下一帧图像上配对的颗粒定义为 $[x'_i, y'_i, I'_i]$[如第一帧颗粒 $(x_i, y_i)$ 与第二帧颗粒 $(x'_i, y'_i)$ 配对]，那么我们使用的优势函数可以写为

$$M = \sum_{i=1}^{N} e^{-\alpha\sqrt{(x_i - x'_i)^2 + (y_i - y'_i)^2}} e^{-\beta \max((I_i - I'_i)/I_i, 0)} = \sum_{i=1}^{N} m_i$$

式中，$m_i$ 为第 $i$ 个颗粒对优势函数的贡献；$N$ 为每一帧图像总的颗粒数；参数 $\alpha$ 为两个相邻帧图像之间所允许的空间分离程度，应该为一个颗粒在一帧图像中所能移动的像素数量的倒数。我们通常把 $\alpha$ 设置为 0.2 $pixels^{-1}$，相当于约 1 μm 的距离。在表达 $M$ 时的第二个指数加强了对颗粒荧光强度不匹配的惩罚。因为我们的实验常常包含因为病毒融合所带来的荧光反淬灭，在惩罚之上的优势函数的形式在强度上降低而不是升高。我们通常使用 $\beta = 0.1$。

虽然我们允许颗粒出现或消失，即运动轨迹形成或破坏，但我们要求每一个颗粒与前一帧和后一帧图像的最多一个颗粒连接，即我们不允许一条轨迹分离成多条或多条合并成一条，尽管这样的分离和合并事实上是会发生的并且被其他算法所包容（Arhel et al. 2006）。为了决定帧与帧之间的最适配对，优势函数 $M$ 必须最大限度地超过所有合理的配对。

假如它们的优势分数低于阈值 $m_{min}$，在大多数实验中我们经验地把 $m_{min}$ 优化设置为 0.1，那这个配对将会被丢弃。假如一帧图像中的颗粒用这个算法不能与前一帧图像中的任何颗粒相联系，那么这些颗粒将形成新轨迹的起点。假如一个现有的轨迹不能与正在研究的一帧图像中的任何颗粒相联系，而且这个轨迹小于 $\tau$ 帧的长度（在我们的实验中我们选择 $\tau = 5$），那这个轨迹应该被丢弃。如果这个轨迹比 $\tau$ 帧要长，那就暂且保留在被破坏的轨迹的队伍里，用修改的对优势函数的贡献来与下一帧竞争顶点。修改的对优势函数的贡献为

$$m_i = e^{-\alpha\sqrt{(x_i - x'_i)^2 + (y_i - y'_i)^2}} e^{-\beta \max((I_i - I'_i)/I_i^i, 0)} e^{-\gamma t_i}$$

式中，在第三个指数因子里，$t_i$ 为自从正在研究的轨迹断裂后帧的数量；γ为对断裂轨迹的惩罚参数所设置的参数。在我们的实验中，我们经验的设置 $\gamma=0.25\ s^{-1}$。假如用前面所述的经过修改的算法确定了当前的顶点与断裂的轨迹之间有联系，那么这个顶点就增加到了轨迹中，并且这个轨迹可以从断裂的轨迹名单中剔除而成为正常的轨迹。当噪声波动或其他瞬时的情况干扰轨迹时，这种处理过程可以让追踪继续进行。

**可视化和人工修正**

有时，常常当两个病毒颗粒的运行轨迹十分接近时，上面描述的追踪过程会失败。为了人工的检测和修正诸如此类的追踪错误，我们用 IDL（Research Systems International）开发了一个软件包来展示每一个运行轨迹的图像和它们的原始数据。假如用户认为追踪中的一个错误已经发生，这个轨迹可以在这点同其他任何更合适的轨迹相接合。假如许多追踪错误发生了，这常常表明前面所描述的顶点检测和轨迹生成的参数不是最好的应该被调整。在这个过程的最后，能够产生单个病毒颗粒的轨迹，这个轨迹可以和细胞的相位对比或微分干涉对比（DIC）图像相叠加从而生成在细胞中病毒活动范围的视觉印象。

**轨迹分析**

转运特点分析　　在以下的讨论中一个病毒颗粒的 $x$、$y$ 坐标对应时间的函数用 $x(t)$、$y(t)$来表示。鉴定暴发性的定向转运的一个有用的方法就是观察一个病毒颗粒的瞬时速度对应于时间函数的图表（图 8-4，见图版）。举个例子，在微管上的颗粒运动速度都以 1 μm/s 为数量级，最少会分布在好几帧图像中。因为测量每帧图像中病毒的位置都会有误差，所以对转运速度的测量有时会被掩盖在随机误差中。在这种情况下，我们通常首先计算瞬时速度的每一部分然后用矩形波串滤镜（平均运行）整理为宽度为五帧的图像（2.5 s），即我们先计算

$$v_x(t)=\frac{1}{2.5}\sum_{i=-2}^{2}x(t+i)-x(t+i-1)$$

$$v_y(t)=\frac{1}{2.5}\sum_{i=-2}^{2}y(t+i)-y(t+i-1)$$

然后计算瞬时速度 $v(t)$，如下：

$$v(t)=\sqrt{v_x(t)^2+v_y(t)^2}$$

研究一个颗粒的转运特点的另外一种有用的方法是制作一张关于平均平方位移 $\langle\Delta r^2\rangle$ 对延迟时间 $\Delta t$ 的函数的图表。这个函数通常有如下形式表示：

$$\langle\Delta r^2\rangle=A\langle\Delta T\rangle^v$$

假如颗粒的运行纯粹是扩散的，这张图表将是线性的（$v=1$），有相当于 4 倍二维扩散常数的倾斜。对于定向运动（如在肌动蛋白或微管上运行的动力蛋白），这张图表将是二次方（$v=2$）或超线性的（$v>1$）。其他的标度指数可能代表受限的扩散（$v<1$）或其他复杂的运动。对于长度为 $T$ 的运行轨迹，$\langle\Delta r^2\rangle$ 是这样计算的

$$\langle\Delta r^2\rangle=\frac{1}{T-\Delta t}\sum_{i=1}^{T-\Delta t}[x(t)-x(t+\Delta t)]^2+[y(t)-y(t+\Delta t)]^2$$

为了避免取样差错所带来的人为影响，保证使用的最大的 $\Delta t$ 值比总的运行轨迹的长度 $T$ 要小很多是重要的。

荧光强度分析　对于标记有足够高密度的可淬灭的亲脂性染料的脂肪包裹的病毒来说，单个颗粒的荧光强度能够被用来作为膜融合的报告者。当融合反应发生在内体时，染料扩散到目标膜常常是很快的，荧光强度可以在几秒钟提高到至少 3 倍于融合前的水平（看情况常常会更高）（图 8-4）。所以，从单个病毒颗粒的荧光强度中能够确认病毒的融合事件。依赖于哪一种内体被作为融合目标，被标记的融合后膜可能会大于衍射限制的点的大小并且明显不对称。虽然融合后膜的荧光强度在刚刚融合后应该会大致稳定，细胞内的膜的循环和分裂事件能在十几秒钟内把开始明亮的物体变为一些更暗的结构。

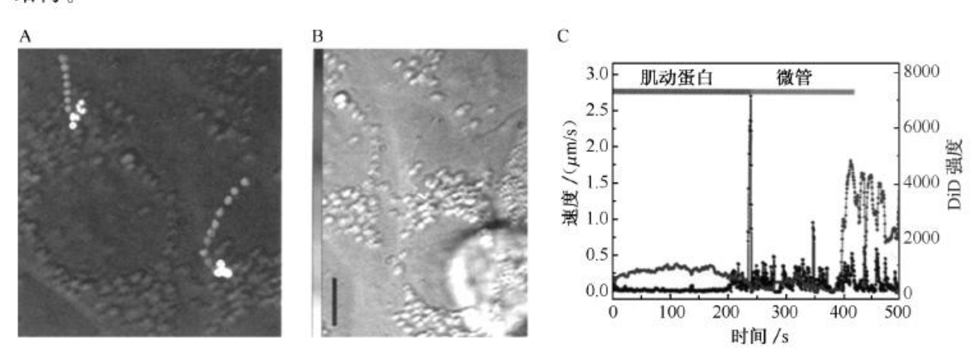



图 8-4　在活细胞中流感病毒的转运和融合。流感病毒外衣被足够高密度的标上了 DiD 以至于来自每个染料的荧光部分被淬灭。病毒与内体的融合导致了荧光强度的明显升高，这是因为 DiD 分子扩散到更大的内体膜中去了。A. 在活的中国仓鼠卵细胞（CHO）中的两个流感病毒的层叠的、随时间流失的图像。从蓝色/粉红色到黄色/白色快速颜色的改变表明了一次剧烈的荧光去淬灭，即病毒与内体的融合。B. 其中一个病毒的物理运行轨迹。这个轨迹用颜色来代表时间，旁边的颜色校准条表明了 0（黑色）～500 s（黄色）的一个一致的时间轴。红色的星形表示融合的时间。条的尺寸为 10 μm。C. 病毒速度（黑色）和 DiD 荧光强度（蓝色）的时间轨迹。结合使肌动蛋白丝和微管解聚的药物实验，我们发现病毒颗粒在细胞外周缓慢运动是肌动蛋白依赖的，而在或向细胞核周快速运动是微管依赖的。（引自 Lakadamvali et al. 2003）

多色成像分析　当图像被多光谱通道收集时，这些图像可能不能准确的叠合，因为光学路径不可能完全相同或者因为可能性的色彩偏差。为了弥补这些缺陷，我们记录了校准样本的图像，这些校准样本是由黏附到载玻片上的 0.2 μm 的荧光珠子（Invitrogen）所产生的。这些珠子的位置能够分辨出来并在不同色彩的通道中用类似于前面所述的对病毒颗粒追踪的算法进行比对。因为珠子足够明亮，珠子的图像在不同色彩的检测通道中都能够被看见。

因为通道之间的误差可能包括放大的差异、色彩的偏差或定位偏移，所需的校正不能笼统地说成简单的线性或反射转换。为灵活地对这些作用进行阐述，我们在左边和右边通道的珠子坐标之间用非线性曲线拟合（来自 Research Systems International 公司的 IDL 软件中的 POLYWARP 函数）得到了一个四项式的转换。一旦这个非线性转换被确定下来了，它可以用来对不同光谱通道间的图像坐标进行转换。

对并排的彩色通道的荧光强度进行的比较可以用来测量两个不同荧光标记结构的共

定位。这样的例子包括标有荧光融合蛋白的细胞结构和病毒颗粒（图 8-5 和图 8-6，见图版）、病毒壳体和基因组，或者连在病毒外衣或壳体蛋白上的 pH 敏感和不敏感的染料。为了达到这些目的，有必要计算来自每个彩色通道的荧光强度，这些彩色通道与被作为时间函数而追踪的点有关，还有必要比较每个通道的局部背景水平来作为围绕病毒颗粒的像素的中间值。

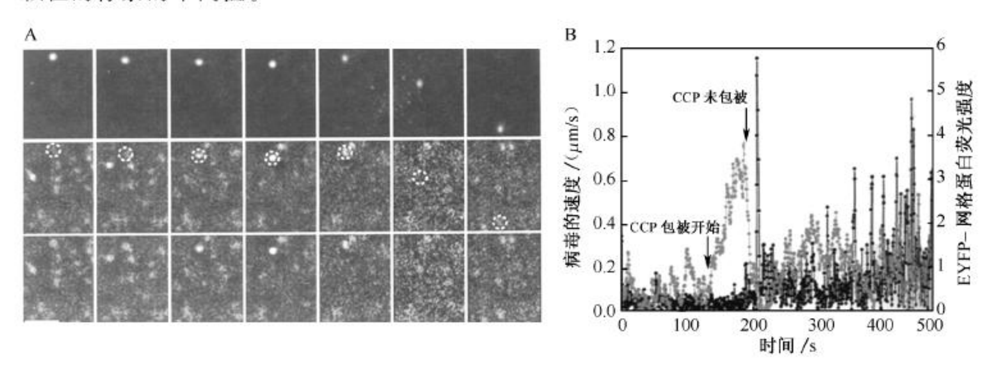



图 8-5　流感病毒通过网格蛋白包裹的陷阱（CCP）内化。A. 在 BS-C-1 活细胞中对 DiD-标记的病毒（上图和下图中的红色）和 GFP 标记的网格蛋白（中图和下图中的绿色）的快照显示了病毒通过 CCP 的内化。在中图中虚线圈的中心是病毒的位置。红色和绿色信号的叠加产生了黄色。横线长 10 μm。B. 另外一个病毒颗粒通过新生的 CCP 而内化的时间轨迹。黑色代表病毒的速度时间轨迹。高速的运动是微管依赖的。绿色代表与病毒相关的带有 EYFP 的网格蛋白的整合荧光强度。(引自 Rust et al. 2004)

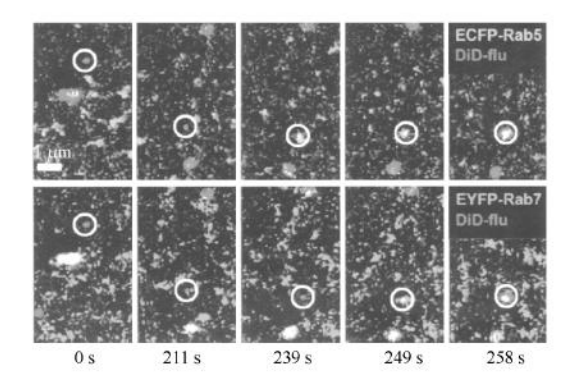



图 8-6　在运动的内体中流感病毒颗粒的转运和融合。流感病毒以可以产生淬灭的密度标记 DiD，这样病毒与内体的融合就可以通过荧光反淬灭而显现出来。早期内体的标记物 Rab5 被标记上 ECFP，晚期内体的标记物 Rab7 被标记上 EYFP。图中显示了一个病毒颗粒（被白圈包围的红色）的快照，它先进入包含有 Rab5（青色）的早期内体。这种内体很快获得 Rab7（绿色），向晚期内体成熟。当 Rab5 和 Rab7 一旦共存时，病毒颗粒就与成熟的内体发生融合。病毒与细胞表面黏附后以秒为单位的时间在底部被显示出来。(引自 Lakadamyali et al. 2006)

## 运用实例

单个病毒的追踪实验已经很大程度上加深了我们对病毒转运和感染机制的理解（Brandenbrug and Zhuang 2007）。在这里我们用来自我们自己实验室的对单病毒追踪实验的一小部分作为例子来提供一个浅显的观点，即从这样的实验中能得到什么样的信息。

通过实时地追踪单个流感病毒颗粒的运动，我们可以从单颗粒的水平研究流感病毒进入的不同阶段。流感颗粒或包含有流感颗粒的囊泡在与细胞表面结合后首先开始肌动蛋白依赖的转运。用细胞松弛素 D 对肌动蛋白丝进行解聚可以破坏这种早期的运动（图 8-4）（Lakadamyali et al. 2003）。包含有流感颗粒的囊泡然后沿着微管向核周区转运，这个病毒载体接着在微管上经历着一种复杂的间断的双向运动。这种微管依赖的转运能够被解聚微管的药物所破坏或被针对微管的马达动力蛋白的微量注射的抗体所阻断（图 8-4）（Lakadamyali et al. 2003）。包装好的病毒与内体的膜融合以便把病毒的基因组注射到细胞中去。在病毒膜上标记高浓度的荧光团可以让我们通过荧光去淬灭的方法知道病毒的融合发生在那里，何时发生（Lakadamyali et al. 2003）。

在表达有荧光标记蛋白的细胞里重复这些流感病毒追踪实验可以提供病毒进入过程机制的信息。当我们追踪在表达有融合在网格蛋白轻链上的 EYFP 的细胞中的流感病毒颗粒和网格蛋白包裹的陷阱（CCP）时（Gaidarov et al. 1999），我们发现在发生融合的病毒颗粒中大约有 2/3 是通过新生的 CCP 进入细胞的（图 8-5）（Rust et al. 2004）。而另外的 1/3 根本没有检测到与 CCP 的持续性的共定位。而且，当我们在表达有 GFP 融合的小窝蛋白的细胞中做追踪实验时发现这 1/3 的部分也没有与小窝蛋白有明显的共定位，然而对照实验表明有超过 95%的 CCP 和 90%的小窝蛋白可以被荧光蛋白信号检测（Rust et al. 2004）。于是我们可以下结论说流感病毒感染细胞是通过多条路径发生有效的融合，包括网格蛋白依赖的路径和网格蛋白和小窝蛋白非依赖的路径。这与原来用电子显微镜和显形负突变所得到的结果是一致的（Matlin et al. 1981；Sieczkarski and Whittaker 2002）。

为了更详细地研究病毒颗粒内化后的转运，我们追踪了流感病毒颗粒感染共表达有带荧光的 Rab5（Sonnichsen et al. 2000）和 Rab7（Barbero et al. 2002）的细胞的过程。Rab GTPase 特异的定位于不同的细胞器中，在复杂的细胞囊泡转运中发挥独特的调节性作用。它们可以作为不同内体囊泡的标记。例如，Rab5 和 Rab7 分别主要与早期和晚期内体有关。对内体动力学的实时分析表明带有 Rab5 早期内体实际上由两个不同的组分组成。其中一个相对固定并且较慢地获得晚期内体的标记 Rab7，而另外一个在微管上有更有活力的运动并且较快地获得 Rab7（Lakadamyali et al. 2006）。我们发现流感病毒喜欢分拣到后面这种有活力的早期内体中。流感病毒融合通常发生在内体成熟的过程中，这时候 Rab5 和 Rab7 共定位于内体（图 8-6）。这种发生在进入早期内体之前的分拣不仅仅局限于流感流感病毒，还可以在其他分子载体上观察到，如低密度脂蛋白和表皮生长因子。与之形成鲜明对比的是转铁蛋白非选择地进入所有

的早期内体。

因为有更多的标记方法被开发用于标记细胞结构和病毒组分，对关于病毒生活周期的更多机制上的细节的揭示将会得益于追踪单个病毒的实验技术。这些未来的实验不仅会阐明病毒感染细胞的方法，而且将会给关于细胞功能的一些基本问题带来新的启发。

## 实验方案 1：用亲脂性的染料标记包装好的病毒

该方案描述了用亲脂性的染料来获得最佳标记以观察流感病毒融合的操作。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

DiD（Invitrogen）
HEPES 145 缓冲液（50 mmol/L HEPES，145 mmol/L NaCl，pH 7.3）
病毒（已纯化，大约 2 mg/ml 的蛋白质浓度）

设备

胶过滤柱（如 GE Healthcare 公司商业化提供的 Nap-5 柱）
液氮< !>
摇床

### 方法

1. 把 100 μl 蛋白质浓度为约 2 mg/ml 的纯化好的病毒溶液与 DiD 混合使终浓度为 0.5 mmol/L，室温下缓慢的摇动孵育 2 h。不同的病毒所需的 DiD 的浓度是不一样的。
2. 用胶过滤柱，如商业化提供的 Nap-5 柱，从没有结合的染料中纯化被标记的病毒颗粒。在 HEPES 145 缓冲液中操作纯化过程，也用这种缓冲液洗脱病毒至 300 μl。
3. 分装被标记的病毒，每份一次性使用（通常 50～100 μl），快速在液氮中冷冻并储存在 −80 ℃。

### 排疑解难

**问题**：病毒的蛋白质浓度不准确。

［**步骤 1**］

**解决方法**：浓度可以容易地用装有紫外线灯的分光光度计进行吸光度测量来估计。病毒特异的消光系数可以从文献中获得。对病毒的蛋白质浓度更准确的测量可以在非变性条件下用比色检测法来获得（如来自 Bio-Rad 公司的经过修改的 Lowry 或 Bradford 检测试剂盒）。

## 实验方案 2：标记病毒外衣或壳体蛋白

该方案描述了在碳酸盐或重碳酸盐缓冲液（pH9）中用氨基端反应的染料标记标记病毒外衣或壳体蛋白。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

试剂

氨基端反应的染料（如 GE Healthcare 公司的 Cy-dyes 和 Invitrogen 公司的 Alexa Fluor-dyes）
DMSO（二甲亚砜）＜!＞
HEPES 145 缓冲液（50 mmol/L HEPES，145 mmol/L NaCl，pH7.3）
碳酸钠＜!＞或重碳酸钠储存液
病毒（大约 2 mg/ml 的蛋白质浓度）

设备

胶过滤柱（如 GE Healthcare 公司商业化提供的 Nap-5 柱）
冷冻干燥器

### 方法

1. 把氨基端反应的染料（买来是固态的）溶解在 DMSO 中，分装并冻干。4℃保存。
2. 准备碳酸钠或重碳酸钠储存液并与 HEPES 145 缓冲液混合生成 pH 为 9.3～9.5 的缓冲液 A。
3. 把 45 μl 病毒储存液（大约 2 mg/ml 的蛋白质浓度）与 45 μl 缓冲液 A 混合。
4. 在 10 μl 缓冲液 A 中溶解一份氨基端反应的染料（约 100 μg）。把不同量的染料溶液（根据想要的标记密度）加到病毒溶液中。室温下缓慢的摇动孵育 1 h。
5. 用胶过滤柱（如商业化提供的 Nap-5 柱）从标记的病毒中除去没有结合的染料。在 HEPES 145 缓冲液中操作纯化过程，也用这种缓冲液洗脱病毒。
6. 分装被标记的病毒，每份一次性使用（通常 50～100 μl），快速在液氮中冷冻并储存在－80℃。

## 实验方案 3：瞬转细胞以表达荧光蛋白

该方案提供了瞬时转染荧光蛋白的融合蛋白到细胞的纲要。

### 材料

#### 试剂

细胞培养液 [无血清 (步骤 2)；有血清 (步骤 3)；无血清和酚红 (步骤 4)]
准备用来转染的细胞
包含有荧光蛋白的融合蛋白的 DNA 质粒
转染试剂 (如 Roche 公司的 FuGene)

#### 设备

荧光显微镜
培养箱，提前调到细胞适合的温度
培养皿 (50 mm 玻璃底，来自 MatTek 公司)

### 方法

1. 在培养皿 (50 mm 玻璃底，来自 MatTek 公司) 中培养细胞至 60%～70%的密度。
   细胞应该处在生长曲线的指数生长区域以便更有效地吸收质粒和表达融合蛋白。太高或太低的密度都是不好的。
2. 在每一个培养皿中，把 1～2 μg 带有荧光蛋白融合基因的 DNA 质粒同 3～6 μl 的转染试剂混合在总共为 100 μl 的无血清的细胞培养液中。按照生产商提供的步骤来操作。
3. 在把混合液加入细胞之前，先要用 2 ml 新鲜的含血清的细胞培养液给细胞换液，再直接逐滴加混合液到细胞上。
4. 用无血清和酚红的细胞培养液洗细胞，然后把培养的细胞放在培养箱中。转染后 24 h用荧光显微镜观察表达水平。如果只有一小部分细胞表达有荧光蛋白或表达量太弱，就让细胞再培养 12～24 h 后再观察。

## 实验方案 4：对单个病毒颗粒的追踪

该方案描述了使用一个或多个荧光标记来做单个病毒颗粒的追踪实验。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

细胞培养液（无血清和酚红）

生长在培养皿中的准备用来观察的细胞

在实验中如果细胞没有表达荧光标记，那么就根据形态来选择细胞。有完整核的、大的扁平细胞通常最适合做追踪实验（如人成纤维细胞、宫颈癌细胞、A549 肺细胞、HuH7 肝细胞、SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞或绿猴 Vero 和 BSC1 肾细胞）。

成像缓冲液（步骤 3 之前预热，步骤 7 之前预冷）

通常使用加 100 mmol/L pH 8 的 HEPES 的无血清和酚红的 MEM 或 DMEM。

储存的病毒（被标记的）< !>

设备

电荷耦合器件（CCD）摄像机

数据采集软件

发射滤镜（用于多色实验）

冰

激光器< !>

有合适组成部分的显微镜

反光镜（二色或多色，用于多色实验）

快门

注射滤器（0.2 μm）

处于所需温度的水浴锅

### 方法

1. 为了准备这个成像系统，要让激光器预热，把 CCD 摄像机冷却到它的工作温度，并让显微镜工作台预热到 37℃或所需的温度。
2. 对于多色实验，要保证狭缝，必要的二色或多色反光镜，发射滤镜处在合适的位置。把激光激发设置在所需的强度。通过数据获取软件控制曝光时间，激光激发次序和图像获取次序（见排疑解难）。
3. 用无血清和酚红的细胞培养液洗细胞。加入 1 ml 温暖的成像缓冲液并把细胞培养皿

放在显微镜上以确定感兴趣的一个或一些细胞，调整显微镜的焦距（见排疑解难）。

4. 把标记的储存病毒稀释在成像缓冲液中，然后过 0.2 μm 的注射滤器以除去大的聚集块。就流感病毒来说，每个细胞结合 10～100 个病毒颗粒是合适的。

要把病毒直接加入到细胞，参考步骤 5 然后跳到步骤 8。要先把病毒预结合到细胞上，参考步骤 6～7，然后跳到步骤 8。

### 不用预结合就加入病毒

5. 当在记录图像序列的同时在原位把病毒加入到细胞中，并在成像时调节任何可能的焦距漂移。

### 预结合病毒到细胞上

在 4℃ 把病毒预结合到细胞上可以阻止内化。

6. 通过把装有冰的小皿放在显微镜台面上来保证它的冷却。保持水浴在所需的温度。一个阀门用来阻止水循环通过温度控制部分。
7. 在成像前用预冷的成像缓冲液洗细胞以去除未结合的病毒。在显微镜上定位感兴趣的细胞并调好焦距。调整激光强度和检测增益以便在不使检测器饱和的情况下对荧光病毒小点进行成像。打开阀门让水循环，提高样本的温度到 37℃。

这个温度跳跃会引起暂时的焦距漂移和台面的热运动。要保证养有细胞的小皿正确的钳制在台面上并在成像中纠正焦距的漂移。

### 数据的收集

8. 在所希望的时间里面收集数据。例如，20～30 min 是足够用来观察流感病毒进入和融合的时间。需要用许多样本来重复实验以积累足够的统计数据和保证可重复性。

## 排疑解难

**问题**：对荧光探针有光损伤和光漂白现象。

［**步骤 2**］

**解决方法**：

1. 使用酶的氧清除系统来减少光漂白。为了准备酶的储存液，把12 mg葡萄糖氧化酶（Sigma-Aldrich）溶解在 100 μl 的 HEPES 145 中，然后加入 25 μl 过氧化氢酶（Roche）。通过在台式离心机离心 1 min 来除去过氧化氢酶样本中的任何碎片。测试实际的酶溶液的用量来保证荧光团光学稳定性最佳而对活细胞的干扰最小。通常 1%的这种酶溶液可以用在包含有 1%的葡萄糖的成像缓冲液中，不至于在 20～60 min的成像时间里明显地干扰细胞系统。HEPES 可以缓冲由氧清除反应所产生的酸性副产物。
2. 优化激光强度和曝光时间以减少荧光探针的光损伤和光漂白而又让所有重要的荧光结构可以被观察到。通常用几个毫瓦的激光强度和 500 ms 的曝光时间来追踪荧光标记的流感病毒颗粒和观察膜融合。更小的病毒由于每个病毒颗粒带有

更少荧光探针常常需要高的激发强度。用来观察表达有荧光蛋白的细胞的条件通常是相似的，但是需要根据不同的细胞标记而优化。

**问题**：如何决定哪个细胞用来成像。

［**步骤 3**］

**解决方法**：在细胞通过瞬时转染而表达有荧光蛋白的多色实验中，显微镜操作者必须确定哪个细胞用来成像。感兴趣的结构［如质膜附近点状的网格蛋白包裹的陷阱（CCP）］应该能被看见并且比自由扩散的荧光标记的蛋白质的背景要明显得更亮（>3倍）。一般来说最好选择在可视情况下对外源的荧光构建有最低表达的细胞。

**问题**：被转染的细胞功能不正常。

［**步骤 3**］

**解决方法**：需要做鉴定实验来证明转染的细胞不会被表达的荧光融合蛋白破坏。带有标记二抗的免疫荧光可以用来检测是否所有的荧光标记的细胞结构都可以被视见。

## 致谢

在此，我们感谢 J. C. Vaughan 先生仔细校正本篇手稿，同时感谢 Zhuang 实验室的其他成员有助的讨论。本工作部分由 NIH 支持。X. Z. 是 Howard Hughes Medial Institute 的研究员。

## 参考文献

Amos W.B. and White J.G. 2003. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol. Cell* **95:** 335–342.

Arhel N., Genovesio A., Kim K.A., Miko S., Perret E., Olivo-Marin J.C., Shorte S., and Charneau P. 2006. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat. Methods* **3:** 817–824.

Axelrod D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2:** 764–774.

Barbero P., Bittova L., and Pfeffer S.R. 2002. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* **156:** 511–518.

Brandenburg B. and Zhuang X. 2007. Virus trafficking-Learning from single-virus tracking. *Nat. Rev. Microbiol.* **5:** 197–208.

Brandenburg B., Lee L.Y., Lakadamyali M., Rust M.J., Zhuang X., and Hogle J.M. 2007. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.* **5:** 183–196.

Chudakov D.M., Lukyanov S., and Lukyanov K.A. 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* **23:** 605–613.

Cudmore S., Cossart P., Griffiths G., and Way M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378:** 636–638.

Dohner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Vallee R., and Sodeik B. 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell* **13:** 2795–2809.

Ewers H., Smith A.E., Sbalzarini I.F., Lilie H., Koumoutsakos P., and Helenius A. 2005. Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 15110–15115.

Gaidarov I., Santini F., Warren R.A., and Keen J.H. 1999. Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol.* **1:** 1–7.

Giepmans B.N., Adams S.R., Ellisman M.H., and Tsien R.Y. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312:** 217–224.

Hannon G.J., ed. 2003. *RNAi: A guide to gene silencing.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hollinshead M., Rodger G., Van Eijl H., Law M., Hollinshead R., Vaux D.J., and Smith G.L. 2001. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J. Cell Biol.* **154:** 389–402.

Lakadamyali M., Rust M.J., and Zhuang X. 2006. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124:** 997–1009.

Lakadamyali M., Rust M.J., Babcock H.P., and Zhuang X. 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 9280–9285.

Lehmann M.J., Sherer N.M., Marks C.B., Pypaert M., and Mothes W. 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J. Cell Biol.* **170:** 317–325.

Lippincott-Schwartz J. and Snapp E. 2005. Imaging of organelle membrane systems and membrane traffic in living cells. In *Live cell imaging: A laboratory manual* (ed. R.D. Goldman and D.L Spector), pp. 555–567. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Loyter A., Citovsky V., and Blumenthal R. 1988. The use of fluorescence dequenching measurement to follow viral membrane fusion events. *Methods Biochem. Anal.* **33:** 129–164.

Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Lukyanov S., and Verkhusha V.V. 2005. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6:** 885–891.

Matlin K.S., Reggio J., Hellenius A., and Simons K. 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney-cell line. *J. Cell Biol.* **91:** 601–613.

McDonald D., Vodicka M.A., Lucero G., Svitkina T.M., Borisy G.G., Emerman M., and Hope T.J. 2002. Visualization of the

intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159:** 441–452.

Naviaux R.K., Costanzi E., Haas M., and Verma I.M. 1996. The pCL vector system: Rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* **70:** 5701–5705.

Newsome T.P., Scaplehorn N., and Way M. 2004. SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science* **306:** 124–129.

Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L., and Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8392–8396.

Pelkmans L., Kartenbeck J., and Helenius A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3:** 473–483.

Pelkmans L., Puntener D., and Helenius A. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296:** 535–539.

Radtke K., Dohner K., and Sodeik B. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* **8:** 387–400.

Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmstrom A., Frischknecht F., Zettl M., Zimmermann T., and Way M. 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat. Cell Biol.* **3:** 992–1000.

Rust M.J., Lakadamyali M., Zhang F., and Zhuang X. 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 567–573.

Sbalzarini I.F. and Koumoutsakos P. 2005. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J. Struct. Biol.* **151:** 182–195.

Shaner N.C., Steinbach P.A., and Tsien R.Y. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2:** 905–909.

Sieczkarski S.B. and Whittaker G.R. 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **76:** 10455–10464.

Sonnichsen B., De Renzis S., Nielsen E., Rietdorf J., and Zerial M. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149:** 901–914.

Stegmann T., Morselt H.W.M., Scholma J., and Wilschut J. 1987. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim. Biophys. Acta* **904:** 165–170.

Stephens D.J. and Allan V.J. 2003. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* **300:** 82–86.

Suomalainen M., Nakano M.Y., Keller S., Boucke K., Stidwill R.P., and Greber U.F. 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* **144:** 657–672.

Vonderheit A. and Helenius A. 2005. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol.* **3:** e233.

Ward B.M. and Moss B. 2001. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J. Virol.* **75:** 11651–11663.

（邵　欣　译）

# 第9章 采用荧光量子点进行活细胞超敏感成像

Sébastien Courty[*] **Maxime Dahan**[*,†]

[*] laboratoire Kastler Brossel, CNRS UMR8552, Physics Department, Ecole normale supérieure; Université, Pierre et Marie Curie-Paris, 75005 Paris, France;
[†] Biology Department, Ecole normale supérieure, 75005 Paris, France

## 摘要

量子点是一种可以用来进行生物成像的半导体荧光纳米颗粒。相对于有机染料和荧光蛋白来说，量子点具有光强度高、光稳定性高的特点。因此，可以用常规的荧光显微镜对量子点进行长时程的检测。使用时，可以将量子点连接在生物分子上，然后追踪这些分子的运动。这里介绍使用单个量子点追踪活细胞膜表面和细胞质内蛋白质的方法。

### 概述

半导体材质的量子点是目前可以代替有机染料来进行生物标记的无机荧光纳米颗粒，直径为5～10 nm（Medintz et al. 2005；Michalet et al. 2005）。相对于传统的荧光染料和荧光蛋白，所有量子点都具有相同的激发光谱，这是量子点的特点之一。也就是说，量子点具有较宽的吸收光谱范围，而发射光谱则很窄，这样量子点就非常适合于进行多荧光检测。而晶体结构赋予量子点相对更高的光稳定性。量子点在单光子激发下的淬灭系数比有机荧光团高10～50倍（Michalet et al. 2005），而在双光子激发时则相对高出2个数量级（Larson et al. 2003）。此外，半导体材质的量子点是电子密度的纳米颗粒，可以用透射电子显微镜进行检测（Dahan et al. 2003；Giepmans et al. 2005）。总之，具有这些特性的量子点，作为生物标记在生物化学研究中，尤其是综合成像和细胞成像研究中具有巨大的潜力。

量子点结合了高亮度和光稳定性这两大特性，非常适用于进行单分子成像（Dahan et al. 2003）。单个量子点可以获得纳米级精确度的定位，并且能在活细胞中进行长时间的追踪（最高达几个小时）。一旦被连接到特定的生物分子上，量子点就成为解释细胞运输和组成的动力学过程的一种工具。这里介绍最初用落射式显微镜进行单个纳米颗粒的检测，以及用单个量子点对膜蛋白分子和细胞内蛋白分子追踪的具体方法、成像过程和数据分析。

## 光学设备

要观察到活细胞内的单个量子点，必须使用远场落射式荧光显微镜（epifluorescence microscopy），而不是激光扫描显微镜。激光扫描显微镜聚焦的激发光照射在标记

物上的时间，只占成像时间 $T$ 的很小一部分，这样就只能得到非常弱的荧光信号。例如，假设在 $T=50$ ms 的时间内获取 100×100 像素的共聚焦图像，其中每个大小为 250 nm的像素中包含单个量子点（发射光波长为600 nm）。目镜数值孔径（NA）大约为 1.4，聚焦点的绿色激发激光的宽度为 λ/NA，约 400 nm。这样，一个点目标相当于在全图中占据 3×3 像素的亚区，而量子点被激发的时间大约为 $(3/100)^2 \times 50$ ms = 45 μs。在这样短的激发时间，能检测到的荧光光子数太少，不能覆盖其他噪声。

而落射式荧光显微镜的问题是它不具有分光功能。在离焦平面会产生很高的背景信号，降低检测灵敏度。全内反射显微镜（TIRFM）可以克服这一限制，但它只能用于检测贴近玻片（<100 nm）或者细胞底膜上的荧光目标。全内反射显微镜的原理和应用在第 2 章中已经进行了详细阐述。

合理的组合光学元件（目镜、滤光器等）、激发光源和敏感的摄像装置才能够在进行单个量子点检测时获得高敏感性。而要获取单个量子点发射的弱信号，关键是要使用数值孔径高的目镜。使用数值孔径大于 1.3～1.4 的油镜可以获得最好的成像效果。水镜可以增加工作距离，但是很可能导致信噪比降低。进行荧光成像时可以使用全光谱灯或者激光作为光源。用全光谱灯作为光源的好处在于，传统的荧光显微镜往往装备有汞灯或氙灯，这些光源的激发光是在统一的可视范围内的。另外，如果要选择激发光波长，只要调节激发滤光器就可以了。激光光源则具有更高的光强度，也许可以提高荧光信号强度，缩短取像时间。但要达到这样的效果，往往需要改良实验设备，从而将激光光束聚焦至目镜的后焦平面。

由于量子点的吸收光谱很宽，因此可以在可见光到紫外的很广泛的区域内选择激发光。对活细胞进行研究，应该选择波长更长的激发光，因为这样可以降低细胞内的自发荧光，同时将光损伤降到最低。我们发现，绿色（约 530 nm）的激发光可以有效获得黄色到红色范围的发射光。选择精确的发射光滤光片对于增加信噪比也很重要。目前量子点已经商品化，一些制造商（如 Omega Optical 或 Chroma）已经根据量子点的光谱特性设计了干涉滤片。这样的滤片可以为检测单个纳米颗粒提供足够高的灵敏度。

对单个量子点进行成像和追踪必须使用敏感的摄像装置。不同的实验，对视野范围、摄像速度、量子产率都有不同的要求，要根据这些参数来正确选择摄像装置。大体上说，背光激发的电荷耦合器件（CCD）灵敏度最高（量子产率>90%），因此能得到最佳的成像效果。一旦结合了电子倍增技术（EM），就可获得高灵敏度高速度结合的效果。例如，用 EMCCD 成像装置对活细胞内的单个量子点进行检测，可以在 5 ms 的时间内的得到较高信噪比（>10）的图像。要通过追踪计算（见下文），获得较高的共定位精确程度，应该使用像素大小（物理大小/光学放大倍数）在 80～220 nm 范围内的取像装置（Thompson et al. 2002；Yildiz et al. 2003）。

## 光学设备灵敏度校准

在对任何生物学样本进行单分子实验之前，应该评估光学设备（包括物镜、滤光器、摄像装置和激发光源）检测单个量子点的能力。可以采用下述步骤。

1. 用甲醇、丙酮和水漂洗盖玻片。用干净的压缩空气或者氮气风干盖玻片。

2. 将一滴（10～20 μl）量子点水溶液（1 nmol/L）滴在盖玻片上。5～10 min 之后，用水漂洗盖玻片，用干净的压缩空气或者氮气风干盖玻片。

3. 将盖玻片至于显微镜上并聚焦在其表面。为了方便聚焦，可以用荧光笔在玻片背面对物镜的一侧做标记（如果使用倒置显微镜，将标记面朝上）。

4. 单个量子点在衍射范围之内，因此可以方便地在目镜中观测到。点的空间范围在 λ/2NA（λ 为量子点的发射波长）之内。单个量子点根据其荧光间隙（闪烁）来定义，即高荧光强度和低荧光强度的过程随机连续出现。

因为随着激发光强度的增加，闪烁的频率也会增加，因此必须检测在实验的接收时间内能够使得单个量子点被检测到的最小激发强度。

## 可溶性量子点的胶质特性和生化性质

目前，已经可以通过多种商业途径（Invitrogen 和 Evident Technology）得到可溶性的半导体材质量子点。通过在纳米颗粒外包裹一层有机颗粒，量子点即可溶于生物缓冲液，而将聚乙烯乙二醇嫁接在量子点表面能够减少量子点和生物表面的非特异性结合（见综述，Medintz et al. 2005；Michalet et al. 2005）。可溶性量子点的胶质特性（极性和体积）能够根据不同的大分子（两性分子聚合物、磷脂胶束、多肽等）的本质和特性而改变。特别是，量子点的水动力直径 *D* 已经可以显著大于无机内含物（5～10 nm）。此外，已有报道，商业化纳米颗粒 *D* 值已经接近于 30～40 mm（Yao et al. 2005）。但是这样的尺寸会对所标记的生物分子进入细胞特定部位（如囊泡、突触）构成障碍，而且可能影响它们处于复杂的生物环境，如在细胞质或者细胞核中的运动。使用蒸发光散射技术、尺寸排阻色谱或者荧光干涉显微术等可以估计给定量子点的 *R* 值（水动力半径）。

以下一系列的方法介绍了量子点的准备，以及如何标记、成像和追踪单个蛋白质分子。

# 实验方案 1：纯化功能性量子点

商业化的量子点有些未连接到特定生物分子表面，也有连接到生物分子表面而被功能化的。功能化的量子点，通过链霉亲和素、蛋白 A 或抗体连接到量子点的表面。在量子点溶液中往往悬浮着未结合量子点的生物大分子，这些生物大分子对于活细胞成像或其他荧光检测都是有害的。因此必须使用尺寸排阻色谱法纯化功能化的量子点。这里介绍一种使用 MicroSpin SR-400 柱（GE Healthcare）的简单方法。

对部分实验来说，相对于购买商业化的功能性量子，将非功能化量子点耦合到生物大分子上更为便易。使用带有活性表面基团（氨基酸、羟基）的量子点，通过传统的交联方法就能够以化合键的方式将量子点结合到蛋白质或者核酸上。www.invitrogen.com 以及 www.evidenttech.com 公司网页提供具体操作过程。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

量子点溶液 50 μl（100 nmol/L）

### 设备

微型离心管（1.5 ml，常规圆柱形）

MicroSpin SR-400 柱（GE Healthcare）

分光光度计

超声波仪

紫外灯<!>

涡旋振荡器

## 方法

1. 涡旋振荡数分钟，在 MicroSpin 中重悬树脂（resin）。
2. 将管盖旋转 1/4 圈，将底部取下。
3. 将 MicroSpin 柱置于 1.5 ml 离心管中。
4. 735 *g* 离心 1 min。
5. 将 MicroSpin 柱置于新的低结合性的 1.5 ml 离心管中。
6. 除去盖子。
7. 缓慢地将量子点溶液加到树脂的中心上方，注意不要损伤底部。
8. 735 *g* 离心 2 min，收集离心管中纯化的量子点。

   推荐使用紫外光确认荧光。如果柱中的荧光并不是均匀分布（如荧光聚集在树脂的顶部），将量子点置于超声仪中数分钟，然后离心除去聚集的量子点。
9. 用分光光度计检测纯化的量子点的浓度。

## 实验方案 2：追踪单个膜蛋白

在过去的几年中，对膜分子进行单分子追踪成为解释细胞膜分子结构的一种方法（Saxton and Jacobson 1997）。通过用橡胶珠、40 nm 的纳米金颗粒或者小的有机荧光基团标记蛋白质和脂类，可以分析蛋白质和脂类侧向运动动力学及其原理。这类的研究提示细胞膜被划分为许多微区。用量子点进行膜表面分子的追踪有许多优势：①量子点的尺寸界于有机染料（1～4 nm）和珠荧光（100 nm～1 μm）之间，接近于单个大分子；②量子点具有较高的光稳定性，可以进行长时间观察；③可以很方便地平行检测同一视野下的多个量子点；④由于量子点具有特殊的吸收光谱特性，有利于进行多荧光成像。

一般对膜分子进行标定，使用标记过的抗体或者配体来识别膜分子的细胞外抗原决定簇。通过不断地减少标记的浓度，被标记的目的分子的比例就会下降，最终达到能够检测和追踪单分子的水平。这里介绍一种用生物素化标记一抗和用链霉亲和素标记量子点的方法。Bannai 等（2007）对该方法进行了一些修改，修改后的方法在一抗不能被生物素化，而需要用 Fab（抗原结合片段）的情况下使用的。

标记的状况很大程度上依赖于一抗的亲和性。因此，一抗的稀释倍数和孵育时间都要根据实验具体情况进行调整。在单个量子点成像条件达到最优化之后，需要通过不进行一抗标记或者使用其他抗体进行标记的方法来检测一抗的特异性。进行系列成像的时间取决于蛋白质的周期。用酸洗的方法（Tardin et al. 2003）或者用内吞蛋白和目的蛋白双标记的方法可以检测量子点标记蛋白的内吞。图 9-1 显示了再转染系统用量子点进行表面标记的例子。

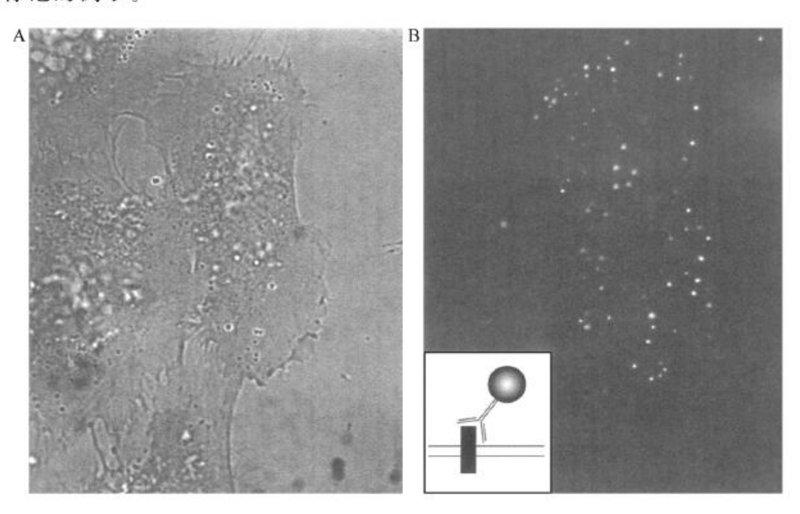



图 9-1　对转染细胞进行表面量子点标记。A. 对培养的 HeLa 细胞进行明场成像。B. 荧光成像。只有一个细胞被成功转染，转染分子为胞外端带有 myc 标记的膜受体。单个点对应于用抗 myc 抗体和量子点标记的受体（见 B 图中插入图）。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

### 试剂

针对一个细胞外抗原决定基的生物素化一抗（单抗或多抗）

硼化钠

牛血清白蛋白（BSA；Sigma-Aldrich）

玻片培养细胞

以下所用的孵育体系对应于 18 mm 直径的圆形玻片。

DMEM 细胞培养液

使用不含有酚红的 MEM 培养基（Invitrogen，31053028)。该溶液含有4500 mg/L D-谷氨酸、非必需氨基酸，无 L-谷氨酸和丙酮酸钠。

胎牛血清（FVS）

HCl（1 mol/L）< !>

HEPES（1 mol/L）

成像缓冲液（MEN-AIR）

48 ml DMED 溶液

10%（*V*/*V*）FVS

1mol/L HEPES 溶液 1 ml（终浓度：20 mmol/L）

500 μl L-谷氨酸（终浓度：2 mmol/L）

500 μl 丙酮酸钠（终浓度：1 mmol/L）

如果要观察很长时间，溶液中可以补充 1%（*V*/*V*）青霉素-链霉素。成像缓冲液需新鲜配置并且存放不超过 2 天。

L-谷氨酸（200 mmol/L；Invitrogen)。

NaOH（1 mol/L）< !>

青霉素-链霉素（GIBCO，Invitrogen，Carlsbad，CA）< !>

使用青霉素 G（盐溶液）和链霉素硫酸盐溶解在 0.85%生理盐水，至终浓度为 10 000单位青霉素、10 000 μg/ml 链霉素。

4×QD 结合缓冲液

将 2 g 十水四硼酸钠（纯度-ACS 试剂 99.5%～105.0%）和 4.885 g 硼酸（分子生物学约 99%）溶解在 400 ml 水中。用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 8.0 ± 0.2。定容至 500 ml。该缓冲液可以在室温下保存一年。

1×QD 结合缓冲液

将 4×QD 结合缓冲液用水稀释，加入 BSA 至终浓度（*m*/*V*）为 2%，及叠氮钠至终浓度 0.05%。过滤除菌并 4℃保存。该缓冲液可存放若干月。

量子点链霉亲和素交联剂（1 μmol/L；Invitrogen）

叠氮钠< !>

丙酮酸钠（100 mmol/L；Invitrogen）
十水四硼酸钠（纯度-ACS 试剂 99.5%～105%）
蔗糖（1.43 mol/L）
　　4℃保存。

设备

玻片（圆形，直径 18 mm）
细胞培养箱
成像小皿（如 Attofluo 细胞小皿，Invitrogen）
预热至 37℃的保温器

## 方法

1. 将铺有细胞的玻片置于预热在 37℃的表面上，用 MEM-AIR 漂洗 3 次。
2. 用 100 μl 生物素化处理的一抗（1～10 μl/ml）37℃孵育细胞 10 min。
3. 用 MEM-AIR 清洗样本 3 次以上。
4. 将量子点溶解在 100 μl 的 1×QD 结合缓冲液中，到终浓度为 1 nmol/L，加入蔗糖至终浓度 215 mmol/L，预热至 37℃，孵育细胞 1 min。
5. 用 MEM-AIR 清洗细胞 5 次以上，除去未结合的量子点。
6. 将玻片置于小皿中，浸没在 MEM-AIR 中，在室温下或者 37℃进行成像。
7. 连续成像或者进行间隔（time-lapse）成像。
   在对感兴趣的微小区域（如 64×64 像素或 128×128 像素）进行成像时必须连续取像，才能获得高的数据转换速度。

## 实验方案 3：追踪单个细胞内蛋白质

追踪量子点标记的单分子蛋白质的应用范围，并不局限于膜表面，将其拓展至活细胞内蛋白以及核内蛋白是一大挑战。这类的研究提供细胞内生物大分子运动的定量信息，能够帮助我们进一步了解复杂的生物学过程，如信号转导、细胞分裂或者运动。在对细胞内生物大分子进行成像时，要达到单分子的敏感度，还有许多待解决的问题。首先，量子点要进入细胞内，接触单分子尺寸的目的物，并且保持被标记分子的完整性。其次，细胞内区域和细胞器会发出自发荧光，因此单个量子点的荧光处于背景很高的环境中。

以下介绍的方法已经能够成功实现对活细胞中单个生物素化标记并偶联链霉亲和素包被量子点（QD-SAV）的激酶分子进行检测（Courty et al. 2006）。以下将具体介绍将量子点内化至细胞质内，在成像时保持细胞活性以及光学检测等具体过程的操作。

在单分子研究中，QD-SAV 在高渗条件下与终浓度为 1 nmol/L 的生物素化蛋白质偶联（最佳比例为 1∶1）。然后依靠胞饮囊泡的渗透裂解，将偶联反应的产物（QD-P）带入到活细胞中（如哺乳动物 HeLa 细胞）（Okada and Rechsteiner 1982）。在高渗溶液中，胞饮囊泡的渗透裂解并不会影响培养细胞的生存，也不会导致溶酶体内酶的释放。和其他细胞内化技术，如与微注射相比，该技术更简单，且重复性更高，因为所有细胞能同时在同一情况下被转染。图 9-2 显示了对 QD 标记的单个蛋白质进行检测的例子。

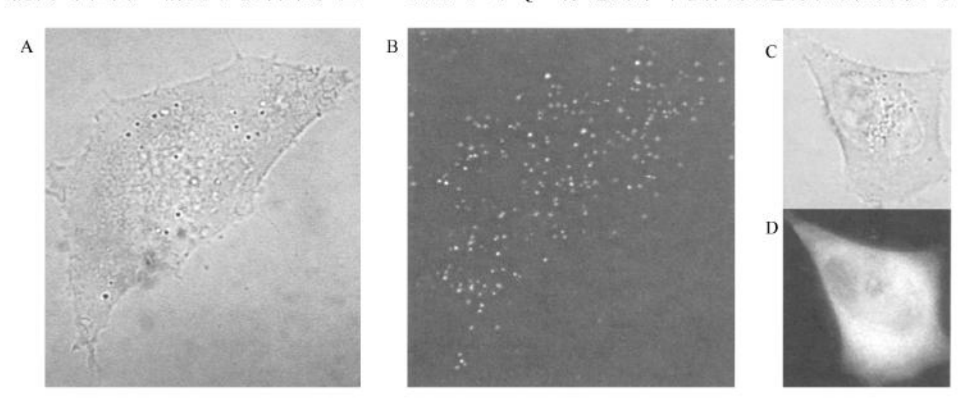



图 9-2　检测量子点标记的单个细胞内蛋白质。A. 培养 HeLa 细胞的明场成像。B. 对内化入细胞质的单个量子点进行荧光成像。C、D. 用同样的方法将荧光葡聚糖内化入细胞，荧光葡聚糖分子在细胞质内很快扩散，全细胞被均一的染色。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

### 试剂

针对一个细胞外抗原决定簇的生物素化一抗（单抗或者多抗）

$CO_2$ <!>

玻片培养细胞

以下所用的孵育体系对应于 18 mm 直径的圆形玻片。

DMEM 细胞培养液

胎牛血清（FCS）

胎牛血清（FVS）

谷氨酸盐（2 mmol/L）

HEPES（1 mol/L，pH7.4）

细胞胞饮试剂（Influx-pinocytic cell-loading regent；Invitrogen）

高渗溶液按照 Invitrogen 产品介绍（I-14402）配制。

高渗裂解液

将无血清 DMED 和水以 6∶4 的比例混合。

KCl <!>

$KH_2PO_4$

NaCl

MEM 成像培养基（GIBCO，Invitrogen，Carlsbad，CA）

在该溶液中加入 2 mmol/L 谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素和 10%FVS。

$Na_2HPO_4$

NaCl

10×磷酸盐缓冲液（PBS）

80.06 g NaCl

2.02 g KCl <!>

2.05 g $KH_2PO_4$

23.3 g $Na_2HPO_4$

溶解在 1 L 水中。

聚乙二醇（PEG）

青霉素-链霉素 <!>

蔗糖

## 设备

高压灭菌器

Attofluor cell chamber（A-7816，Invitrogen）

玻片（圆形，直径 18 mm，灭菌）

培养皿

镊子（灭菌）

封口膜

塑料盒

染色缸（或者小架子）

加热器

棉纸（无菌）

离心管（灭菌；15 ml 和 25 ml；Falcon BDF Biosciences）

涡旋混合器

37℃及 80℃水浴

## 方法

### 在高渗溶液中孵育 QD-SAV 和生物素化蛋白

1. 预热 5 ml 无血清 DMEM 溶液至 37℃。
2. 将 PEG（蜡质固体至于蔗糖晶体上端）加入装有细胞胞饮试剂的管中，置于热水（约 80℃）中 2 min，融化 PEG。
3. 将管盖打开，迅速加入 4.7 ml 预热至 37℃的无血清 DMEM。
4. 盖上管盖，剧烈地涡旋振荡充分溶解蔗糖晶体。
5. 溶液混匀后，加入 250 μl 胎牛血清（FVS）和 50 μl 浓度为 1 mol/L pH7.4 的 HEPES 缓冲液（或其他合适的缓冲液，依细胞类型而定）。
6. 盖上管盖，螺旋振荡数分钟。

   混合物可在 4℃存放数周。在使用之前不要打开管盖。使用时，在无菌环境下打开管盖（如接近火焰）以保证高渗溶液无菌。检查溶液的颜色，如果使用酚红为 pH 指示剂，在没有污染的情况下溶液应该为红色。

### 将 QD 内化至培养的活细胞内

7. 将培养细胞以 $1.5\times10^5$ 密度种在直径 18 mm 的玻片上，加入含 10%胎牛血清（FCS）的 DMEM 培养液中，在 5% $CO_2$ 37℃的条件下培养。
8. 预热含有 QD-P 的低渗溶液、高渗裂解溶液和 video-MEM 溶液各 100 μl 至 37℃。
9. 用灭菌的镊子从培养皿中取出培养有细胞的玻片。
10. 用玻片的边缘触碰无菌纸以除去多余的 DMED 培养液。
11. 将玻片的细胞面朝上置于 5 cm×5 cm 的封口膜上，用加热器加热至 37℃。
12. 快速并柔和地将 100 μl 含有 QD-P 的高渗溶液滴于种有细胞的玻片上边缘。
13. 将高渗溶液中的玻片置于 37℃培养 10 min。用塑料盒覆盖在玻片上避免蒸发（见排疑解难）。
14. 重复步骤 10。
15. 将玻片垂直放入染色瓶（或者小架子）中，加入至少 7 ml 预热的高渗裂解液 120 s。将细胞培养在高渗溶解液中，在胞饮小泡裂解之后，QD-P 便会均匀地释放到细胞质中。
16. 重复步骤 10。
17. 将玻片置入成像小皿中，加入预热至 37℃的成像溶液中。
18. 将细胞置于 37℃ 10 min 促进细胞复苏。
19. 用合适的设备对细胞进行成像（见排疑解难）。

## 排疑解难

**问题**：细胞在玻片上不贴壁。

［**步骤 13**］

**解决方法**：按照以下方法使用多聚赖氨酸使非贴壁细胞（如果蝇细胞）附着在玻片上（这一步对步骤 15 非常重要，因为黏稠的高渗溶液可能会将细胞带离玻片）。

1. 将玻片灭菌。
2. 用 PBS 清洗玻片以除去碎片，并且均一地润湿玻片表面。
3. 将 200 μl 多聚赖氨酸溶液滴在玻片上，覆盖玻片表面（1 mg/ml，Sigma-Aldrich）。
4. 将玻片孵育在多聚赖氨酸溶液中至少 1 h。
5. 吸去多聚赖氨酸溶液，并且充分干燥玻片（如有必要，可干燥过夜）。
6. 用 PBS 温和的清洗玻片（至少 5 次）除去多余的多聚赖氨酸，因为多聚赖氨酸会对细胞产生毒性。
7. 将铺有多聚赖氨酸的玻片置于 PBS 中，使用前可在干燥干净无尘的环境中 4℃ 储存 2 周。

**问题**：细胞生存率低。

［**步骤 15**］

**解决方法**：降低细胞暴露在高渗裂解液中的时间，时间过长会导致细胞膜出泡。

**问题**：细胞自发荧光。

［**步骤 19**］

**解决方法**：选择正确的量子点发射波波长对于克服细胞自发荧光非常重要。细胞自发荧光来自内源的代谢，并且具有 4 种不同的激发和发射波长峰值：色氨酸峰（激发光 290 nm，发射光 330 nm）、NAD（P）H 峰（激发光 350 nm，发射光 450 nm）、核黄素（FAD）峰（激发光 450 nm，发射光 530 nm），以及一个尚未确定的峰（激发光 500 nm，发射光 530 nm）（Heintzelman et al. 2000）。要特别注意的是，在活细胞内细胞的自发荧光会有很大的变化。例如，新鲜准备的细胞自发荧光强度很低，随着培养时间的增加会达到一个平台。为了避免和细胞自发荧光波长重叠，推荐使用发射波长为 655 nm 的红光。

在活细胞内追踪单个量子点最困难之处是量子点在细胞内的三维运动，因为量子点会移动到焦点界面之外，导致离焦。遗憾的是，目前还没有普遍适用的方法来解决这个问题。因此推荐聚焦在细胞相对较伸展的部位。

## 数据分析

进行单分子追踪研究的一大出发点是从记录的一系列图像中获取生物学信息。大体上说，数据分析分为两部分：①重建单分子运动轨迹；②分析运动轨迹从而获得单分子运动参数。

## 单分子运动轨迹重建

**定位精确度**

信噪比（SNR）值对于单分子点的定位精确度有直接影响。量子点的尺寸远小于激发波长 λ，因此荧光点的形状符合光学系统的点扩散方程（PSF）。其宽度 $w$ 由显微镜的光学分辨率确定（如 $w \approx \lambda / [2 \times NA]$），其中 NA 为目镜的数值孔径。在纳米颗粒发射光波长大约为 600 nm，而油镜目镜的数值孔径 NA=1.3 的情况下，相应的 $w$ 约为 230 nm。在检测敏感度受到光子噪声限制时，要精确地获得 $w/SNR$，可以通过二维高斯方程对 PSF 进行拟和，拟和中心具有更高的分辨率（Thompson et al. 2002；Yildiz et al. 2003）。一般对单个量子点标记的膜受体（取像时间为 50～100 ms）进行成像时 SNR 值大约为 30，此时的精确度可以达到 5～10 nm。

**图像处理及单个量子点轨迹的获取**

图像处理和轨迹重建的过程分为两个阶段：①检测单个荧光点；②确定点之间的关系。首先，用一种关联的方法检测连续叠加图像中每帧图像中荧光点的位置。围绕荧光图像中一小块区域的局部极大值计算真实的荧光图像和 PSF（从定标图像获得）的近似程度。根据对荧光图像噪声的预估确定一个阈值，在该阈值之上选择相关极值，这一极值便代表量子点标记的分子的位置。通过这些局部极值，应用最小二乘高斯拟和来确定荧光点的中心，空间分辨率通常可以达到 5～40 nm（根据 SNR）。

确定每一帧图像中量子点的位置，并将这些目标量子点相应的点联系起来。假设受体是自由扩散的，计算在某一帧图像中指定位置检测到的荧光点，在下一帧图像中另一位置出现的概率。然后应用极大似然准则将连续两帧图像中的点联系起来。该方法的原理见图 9-3。

闪烁（荧光间歇现象）的问题也为追踪单个量子点造成一定困难，因为荧光点会随机暂时地消失一段时间。在实验时应尽可能降低激发光的强度，从而降低闪烁速率。解决闪烁问题的一种简单的方法，在于通过计算获得连续的轨迹，然后人工地将对应于同量子点的轨迹连接起来。可以在 Image J 软件中找到作为插件的综合追踪程序（http：//rsb.info.nih.gov/ij/）。目前也已经针对性地开发了追踪算法用以自动化地解决荧光间歇问题，可以将相隔一个或者多个取像时间的两帧图像上的目标点联系起来。http：//www.lkb.ens.fr/recherche/optetbio/tools/sinema 提供基于以上算法的软件。

## 单一轨迹的分析

确定了二维轨迹（$x[t]$，$y[t]$）之后，计算 $\rho(t)$，均方位移（MSD）是获取物理信息的方法之一。由以下方程计算得

$$\rho(n\pi) = \frac{1}{N-n}\sum_{i=1}^{N-n}[(x((i+n)\tau) - x(i\tau))^2 + (y((i+n)\tau) - y(i\tau))^2]$$

式中，$\tau$ 为取像时间；$N$ 为取像总数。通过计算 MSD，可以分析分子运动的本质。MSD 以 $4D$（其中 $D$ 为扩散系数）为斜率呈线性变化表明所追踪分子的运动形式为自由扩散。按惯例，参数 $D$ 是通过对 MSD 的数据点 2～5 按曲线 $4Dt+b$ 拟合得到的。参数 $b$ 取决于定位精确度。如果单分子点在其他方向发生运动（速度为 $v$），则 $\rho(t)$ 均值

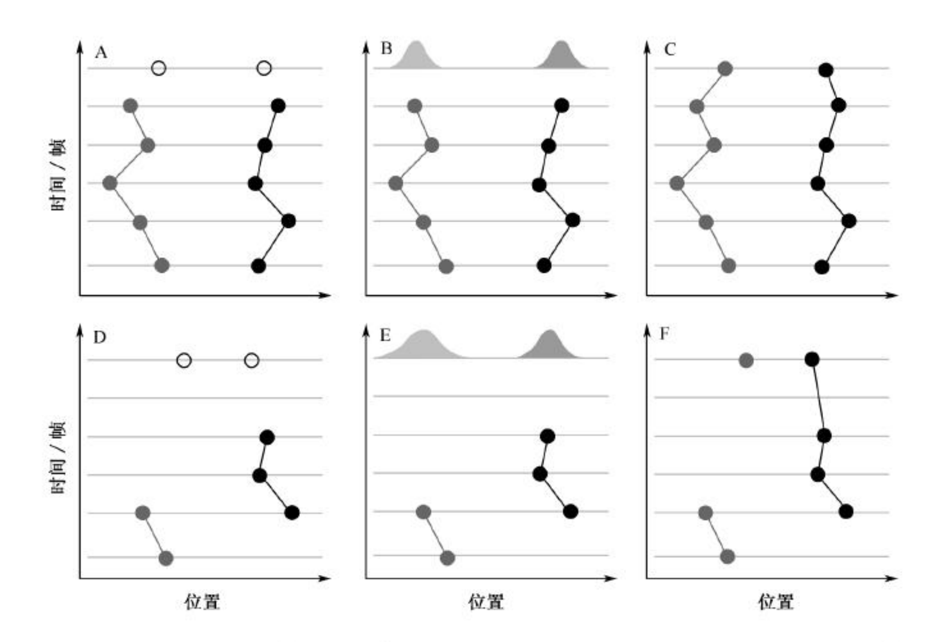



图 9-3 追踪规则。A. 在第 $N$ 帧图像上检测到两个点（空心点）。B. 钟形曲线表示根据第 $N-1$ 帧图像上点的位置推测得到的，该点在第 $N$ 帧图像上各位置出现的概率。C. 将每帧图像中目标点出现概率最大的位置相连得到的轨迹。在探针闪烁的情况下 D，F. 荧光会暂时地消失，研究者需要依靠在图像 $N-2$、$N-3$ 和 $N-4$ 中目标点出现的位置。

应等于 $4Dt+v^2t^2$。相反，如果运动被限定，则 $\rho(t)$平均具有负曲率，并且逼近于一个确定的数值，即检测时间内运动区域的面积。

MSD 是根据有限点形成的轨迹运算得出的，因此必然会受统计误差的影响。可以使用计算机模拟来估计 $\rho(\tau)$的方差 $\sigma(\tau)$，在布朗扩散的情况下也可以用以下公式来进行计算（Qian et al. 1991）：

$$\sigma(\tau) = 4D\tau[(4n^2(N-n)+2(N-n)+n-n^3)/6n(N-n)^2]^{1/2} \quad n \leqslant N/2$$

$$\sigma(\tau) = 4D\tau[1+((N-n)^3-4n(N-n)^2+4n-(N-n))/6n^2(N-n)]^{1/2} \quad n \geqslant N/2$$

由于 $\sigma(\tau)$随着 $n$ 值增加而快速增加，因而要特别注意解决统计波动的问题。尤其是在寻找简单布朗运动的偏差时（Qian et al. 1991）。图 9-4 举例说明扩散特点。

在进行单分子追踪研究时，研究者往往对检测时间内生物分子运动形式的动力学变化感兴趣。然而这些变化不能通过简单计算 MSD 而得到，MSD 只代表整体平均行为。因此需要用更先进的方法来推断运动参数的局部信息。

## 致谢

感谢 Cedric Bouzigues、Marie-Virginie Ehrensperger 和 ENS 的“视觉与生物”组的帮助。感谢 Hiroko Bannai、Cecile Charrier、Sabine Levi 和 Antoine Triller 在膜标记技术方面做出的贡献；感谢 Camilla Luccardini、Giovanni Cappello 和 Yohanns Bel-

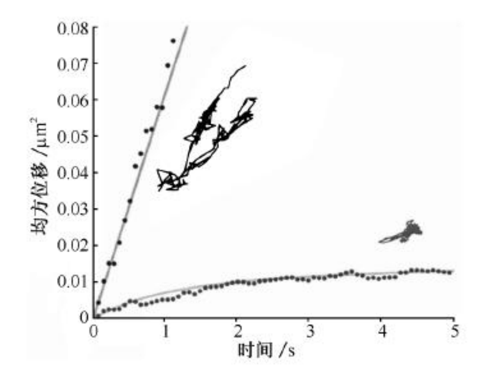



图 9-4　扩散方式：（上方）符合线性 MSD 的自由布朗运动；（下方）被限定的运动，符合饱和的 MSD 曲线。

laiche 为内化量子点做出的贡献；感谢 Stephan Bonneau 和 Laurent Cohen 在图像处理技术的改进方面做出的贡献。

## 参考文献

Bannai H., Levi S., Schweizer C., Dahan M., and Triller A. 2007. Imaging the lateral diffusion of membrane molecules with quantum dots. *Nat. Protocols* **1:** 2628–2634.

Bouzigues C. and Dahan M. 2007. Transient directed motions of GABAA receptors in growth cones detected by a speed correlation index. *Biophys J.* **92:** 654–60.

Courty S., Luccardini C., Bellaiche Y., Cappello G., and Dahan M. 2006. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett.* **6:** 1491–1495.

Dahan M., Levi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., and Triller A. 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302:** 442–445.

Giepmans B.N., Deerinck T.J., Smarr B.L., Jones Y.Z., and Ellisman M.H. 2005. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nat. Methods* **2:** 743–749.

Heintzelman D.L., Lotan R., and Richards-Kortum R.R. 2000. Characterization of the autofluorescence of polymorphonuclear leukocytes, mononuclear leukocytes and cervical epithelial cancer cells for improved spectroscopic discrimination of inflammation from dysplasia. *Photochem. Photobiol.* **71:** 327–332.

Huet S., Karatekin E., Tran V.S., Fanget I., Cribier S., and Henry J.P. 2006. Analysis of transient behavior in complex trajectories: Application to secretory vesicle dynamics. *Biophys J.* **91:** 3542–3559.

Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., and Webb W.W. 2003. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* **300:** 1434–1436.

Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., and Mattoussi H. 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **4:** 435–446.

Meilhac N., Le Guyader L., Salome L., and Destainville N. 2006. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **73:** 011915.

Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., and Weiss S. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307:** 538–544.

Okada C.Y. and Rechsteiner M. 1982. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytic vesicles. *Cell* **29:** 33–41.

Qian H., Sheetz M.P., and Elson E.L. 1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* **60:** 910–21.

Saxton M.J. and Jacobson K. 1997. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26:** 373–399.

Simson R., Sheets E.D., and Jacobson K. 1995. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* **69:** 989–993.

Tardin C., Cognet L., Bats C., Lounis B., and Choquet D. 2003. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J.* **22:** 4656–4665.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82:** 2775–2783.

Yao J., Larson D.R., Vishwasrao H.D., Zipfel W.R., and Webb W.W. 2005. Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 14284–14289.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

## 网络资源

**http://rsb info.nih.gov/ii/ImageJ**.Image processing and Analysis in Java.

**http://www.lkb.ens.fr/recherche/optetbio/tools/sinema**.Sinema,aprogram to detect and track fluorescent particles in time-lapse image sequences. Optics & Biology Group, Laboratoire Kastler Brossel, Département de Physique de l'Ecole normale supérieure, Paris, France

# 第 10 章　活体实时基因表达成像技术

Amber L wells[*]　John S. Condeelis[*†]　Robert H. Singer[*†]　Daniel Zenklusen[*]

[*] Department of Anatomy and structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461; [†]Gruss-Lipper Biophotonics Center, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461

## 摘要

生物体的各种细胞通过改变自身基因表达的模式来对外界和内在的信号因子做出应答，这就要求基因表达过程中一系列调控步骤的协调。生物成像技术实现了在单个活细胞中实时观察和检测这些步骤。本章讨论荧光 RNA 结合蛋白系统在基因表达的实时单个转录分析中的应用。

## 概述

生物体的各种细胞适应外界刺激和内在因素变化最普遍的方式是改变自身基因表达的模式。细胞必须精确可靠地执行基因表达程序，才能实现通过细胞周期控制繁殖或影响细胞的形态变化，如可以分化为神经元。基因表达整个过程的各调控步骤，包括细胞核内基因的启动、RNA 加工、mRNA 转运及定位、在细胞质中的翻译，都是高度有序的。目前生物成像技术领域面临的挑战是实时观察和检测单细胞的动态过程。高分辨率的荧光原位杂交技术（fluorescence in situ hybridization，FISH）可以在固定细胞上提供单个转录的信息，但它不能进一步地研究 mRNA 在细胞内的运输或遗传信息是如何被翻译成蛋白质。核内 mRNA 分子的合成启动了蛋白质合成前的一系列事件。在转录到达细胞质后 mRNA 的翻译将迅速发生。从人类神经元里获得的数据说明，这整个过程从起始点计算经历了 1 m 的路径，在分子水平上这是个令人难以置信的距离。我们对这过程中的调控步骤还知之甚少。对单个 mRNA 转录的实时活细胞成像可以帮助理解基因表达的不同步骤及每一步骤的动态过程。

在这一章节中，我们描述如何利用荧光 RNA 结合蛋白系统来实现单个转录水平的实时基因表达分析。该系统包含了一个基因编码的标签从而使高分辨率荧光活细胞成像技术能够直接观测在体的 mRNA。图 10-1（见图版）描述了在不同模式系统中这种方法如何观测 mRNA 分子从核内合成到细胞质的定位这一动态过程。我们描述在不同的实验体系中如何设计 MS2 系统以及如何构建 RNA 和绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）报告基因。我们还在两种最为广泛应用的实验体系中介绍成像技术的具体实验方案：培养的哺乳动物细胞和酿酒酵母。另外，我们将描述用来检测单个转录的活细胞成像技术平台的基本构成，并举例说明如何从这一平台获取数据，阐明如何检测和分析单个荧光 mRNA 分子。本章采用大量实验方案来描述 MS2 系统在哺乳动物细胞和酵母中的应用、GFP 校正曲线图的绘制、固定细胞中单分子的检测及成像分析软件

的应用。这些实验方案的“排疑解难”部分为可能的表达和成像难题提供了解决方法。

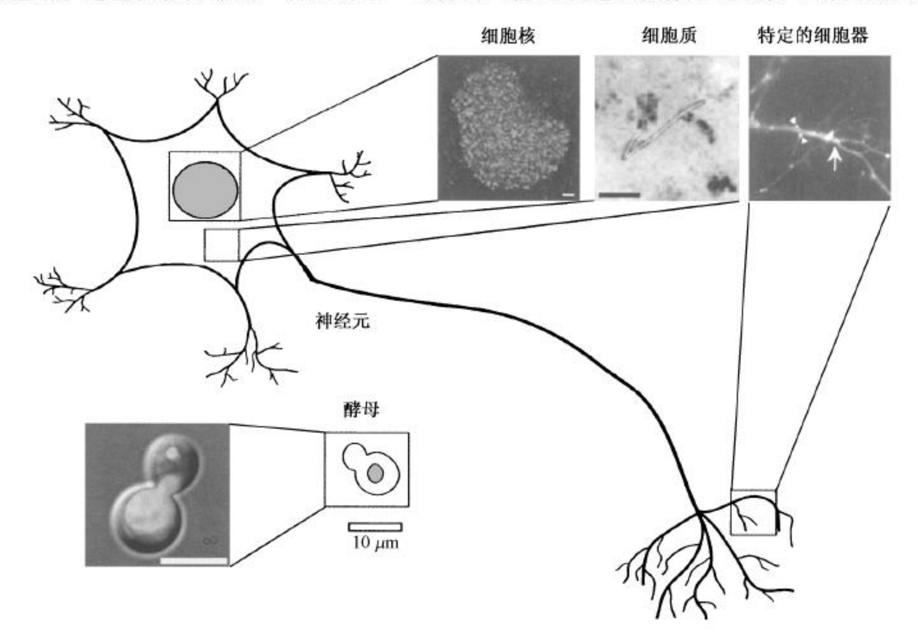



图 10-1 基因表达的成像。转录的 mRNA 从合成到被降解经历了许多调控事件。活细胞成像技术实现了对其中许多环节的动态描述。(左上图) U2OS 细胞核内单个 mRNA 粒子运动的可视化。标尺，2 μm。(摘自 Shav-Tal et al. 2004 [© American Association of the Advanced Science]) (中间上图) COS-7 细胞质中 β-肌动蛋白 mRNA 的运动。绿线显示 mRNA 粒子的轨迹。标尺，2 μm。(经允许摘自 Fusco et al. 2003 [© Elsevier]) (右上图) mRNA 粒子在神经元树突上的转运。(经允许摘自 Rook et al. 2000 [© Society for Neuroscience]) (底部图) 酿酒酵母 *S. cerevisiaear* 系统中子细胞特异的 *ASH1* mRNA 在子细胞芽尖的定位。标尺，5 μm。(经允许摘自 Bertrand et al. 1998 [© Elsevier])

## MS2 系统：实时 mRNA 成像的基因标签

MS2 系统被认为是在体监测 mRNA 表达的最好方法 (Bertrand et al. 1998)。该系统采用一种独特的、基因编码的标签插入到感兴趣的 mRNA 序列里，类似标签蛋白。这一 RNA 标签可以被 GFP 融合的 RNA 结合蛋白所识别，因此实现荧光标记的mRNA 的检测 (图 10-2)。mRNA 和 GFP 报告基因可被暂时转染到细胞里或稳定地整合到基因组里。携带报告 mRNA 的 GFP 融合蛋白的表达使单个细胞上实时监测从转录到翻译的整个过程成为可能。MS2 系统不需要其他细胞水平的操作，因此其信噪比 (signal-to-noise ratio，SNR) 远远高于其他依赖显微注射标记的 mRNA 探针，从而使得对单分子及其动态过程的观测更严密。

RNA 标签是由 19 个核苷酸组成的茎-环序列，含有单链 RNA 结合蛋白的结合位点，这一蛋白质是 RNA 噬菌体 MS2 外壳的病毒样装配必需的 (图 10-2A) (Peabody

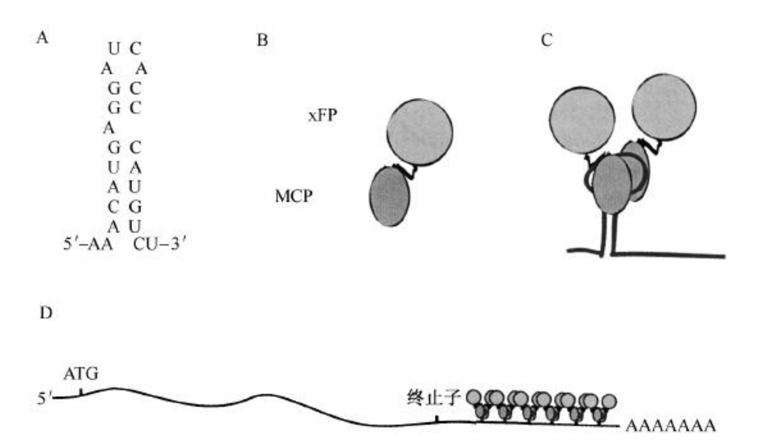



图 10-2 MS2 系统，活细胞中检测 RNA 的基因标记物。A. 一个 19 个核苷酸序列的 RNA 茎-环结构可用作基因标签来标记 RNA（MBS）。B. C. MS2 噬菌体外壳蛋白可结合该茎-环结构。外壳蛋白（MCP）与荧光蛋白（xFP）融合。MCP-xFP 融合蛋白与 MBS 的结合产生一个荧光标记的 RNA。D. 为了检测 MS2 标签的 mRNA，MBS 应被多聚化并插入到一个感兴趣 RNA 中。

and Ely 1992；Valegard et al. 1994)。MS2 外壳蛋白（MS2 bacteriophage coat protein，MCP）与这种茎-环结构有高度亲和力（$K_d = 4 \times 10^{-10}$ mol/L）（Lim and Peabody 1994；Lim et al. 1994)，一旦结合，就不会从 mRNA 脱离（Valegard et al. 1997)。在细胞里构建表达 MCP 和 GFP 的融合蛋白，从而使得含有茎-环序列的 mRNA 被标记(图 10-2B、C)。GFP 是最常用的与 MS2 融合的荧光蛋白，其他荧光蛋白只要能够提供足够的成像信号也可以采用。因此，在这我们将其表示为 MCP-xFP，x 代表任何与 MCP 融合的荧光蛋白。

MS2 结合位点（MS2-binding site，MBS）能被添加到目的 mRNA 中，但并不足以实现在细胞中检测单个 mRNA。因此，为了增加信噪比，必须多聚化 MS2 结合位点(图 10-2D)。不同核苷酸长度的多聚化 MS2 结合位点其应用也相异。MS2 结合位点重复 24 次的序列可能结合 33 个 MCP-GFP 融合蛋白（Fusco et al. 2003)，能对活细胞中单个 mRNA 进行可靠检测（Fusco et al. 2003；Shav-Tal et al. 2004)。然而现在又有研究者报道了 MS2 结合位点重复 96 次的序列（Golding et al. 2005)。

MS2 系统已经被成功地应用于原核和真核系统的活细胞水平基因表达的追踪(Golding and Cox 2004；Golding et al. 2005)。在真核系统如盘基网柄菌中，MS2 系统被报道用于实时监测转录（Chubb et al. 2006)；在 U2OS 细胞（Shav-Tal et al. 2004)、COS-7 细胞（Fusco et al. 2003)、HeLa 细胞（Dynes 2007)、人 HT1080 细胞(Basyuk et al. 2003)、P19（Bi et al. 2003）以及原代培养的大鼠和小鼠神经元细胞(Rook et al. 2000；Banni et al. 2004；Dictenberg and Singer 2007；Dynes 2007）上，有研究者报道利用 MS2 系统实时追踪 mRNA 和 rRNA 在细胞核内和细胞质中的动态过程。在活的植物细胞（Hamada et al. 2003；Zhang and Simon 2003；Campalans et al.

2004)、爪蟾（Forrest and Gavis 2003；Weil et al. 2006)、酵母（Bertrand et al. 1998；Beach et al. 1999）中，MS2 系统可对移动的 mRNA 和病毒颗粒进行定位和成像。

## MBS（MS2 结合位点）标签的 mRNA 表达载体的构建

报告质粒的设计和构建是活细胞上观测 mRNA 实验的首要也是最重要的步骤。把 MS2 结合位点重复 24 次的序列添加到一个 mRNA 中相当于添加 1.4 kb 的核苷酸序列，而该添加序列的长度与目标 mRNA 的长度较为接近，这就可能会影响目标 mRNA 的功能。然而在目标 mRNA 的正确位置插入该重复序列将产生一个具有完好无缺的功能的 mRNA。表 10-1 列出了对不同的细胞类型进行活细胞成像实验时可供选择的几种包含 MBS 的报告载体。

**表 10-1 MBS 报告 RNA 的表达载体**

| 载体 | RNA 或编码序列 | MBS | 调节序列 | 启动子 | 种属 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pRSV-Z-MS2×24 | LacZ | 24 | 无 | RSV | 哺乳动物 | Fusco et al. (2003) |
| pRSV-Z-MS2×24-β-actin | LacZ | 24 | Chicken β-actin 3′UTR | RSV | 哺乳动物 | Fusco et al. (2003) |
| RSV-β-Gal-MS2bs-CaMKII 3′UTR | LacZ | 8 | CaMKII 3′UTR | RSV | 哺乳动物 | Rook et al. (2000) |
| pCMV-DsRE-6×BS-rArc3′UTR | Rat Arc 3′UTR | 6 | Rat Arc 3′UTR | CMV | 哺乳动物 | Dynes and Steward (2007) |
| pCMV-DsRE-6×BS-no3′UTR | DsRed | 6 | No Arc 3′UTR | CMV | 哺乳动物 | Dynes and Steward (2007) |
| pCMV-bNLS-DsRE-6×BS | DsRed | 6 | NLS | CMV | 哺乳动物 | Dynes and Steward (2007) |
| pCMV-DsRE-6×BS | DsRed | 6 | 无 | CMV | 哺乳动物 | Dynes and Steward (2007) |
| 5′K3′K | 荧光素酶 | 3 | Kappa-opioid receptor (KOR) 3′UTR | Kor | 哺乳动物 | Bi et al. (2003, 2006) |
| 5′K3′SV40 | 荧光素酶 | 3 | SV40 poly(A) | Kor | 哺乳动物 | Bi et al. (2003) |
| 5′tk3′K | 荧光素酶 | 3 | Kappa-opioid receptor (KOR) 3′UTR | 胸苷激酶 | 哺乳动物 | Bi et al. (2003) |
| 5′tk3′SV40 | 荧光素酶 | 3 | SV40 polyA | 胸苷激酶 | 哺乳动物 | Bi et al. (2003, 2006) |
| pCaSbcd-(ms2)₆ | *Bicoid* (*bcd*) | 6 | *bcd* 3′UTR | Bcd | 果蝇 | Weil et al. (2006) |

续表

| 载体 | RNA 或编码序列 | MBS | 调节序列 | 启动子 | 种属 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pCaS2-nos-(ms2)$_6$ | *Nanos* (*nos*) | 6 | *Nos* 3′UTR | *nos* | 果蝇 | Forrest and Gavis (2003) |
| dscA-24MS2BS | dscA | 24 | dscA | 内源性启动子 | 盘基网柄菌 | Chubb et al. (2006) |
| pGAL-*lacZ*-MS2-ASH1 | *lacZ* | 6 | *ASH1* 3′UTR | GAL | 酿酒酵母 | Bertrand et al. (1998) |

供选择。

### MS2 结合位点在报告基因中的位置

MS2 结合位点在报告 mRNA 中的位置由报告 mRNA 本身决定。一般而言，为了可以执行前体 mRNA 的正确加工（如剪接、颗粒装配、颗粒在细胞质的定位以及 mRNA 的稳定性），应该避免插入到编码区、内含子区域、5′端非翻译区（5′UTR）和 3′UTR 的已知调节序列。一般常见的 MS2 结合位点在报告基因中的位置介于编码序列和 3′UTR之间（Fusco et al. 2003; Dynes and Steward 2007）。为了避免干扰 3′UTR 的调节序列，MBS 也可以被插入到转录终止位点的附近。

### MBS 重复序列的数目

在不同的实验中，可有不同数目的 MS2 结合位点的重复序列能被插入到报告基因中。通过放大结合位点来增加灵敏度。如果目的是监测单个转录，至少要插入 24 个重复序列。例如，要追踪神经元中 mRNA “小颗粒”，前提条件是必须要有多个 mRNA 形成大的复合物；如果要在酵母中定位 ASH1 mRNA 颗粒，可以采用为数较少的重复序列（Bertrand et al. 1998; Beach et al. 1999; Rook et al. 2000; Banni et al. 2004; Fusco et al. 2004; Dynes and Steward 2007）。然而，由于灵敏性小会导致一部分 RNA 会被遗漏。

### MBS 报告载体的克隆

含有 MBS 的表达载体的克隆这是一个难题，因为在细菌里克隆重复序列时会发生重复序列的重组而导致 MBS 的丢失。为了使 MBS 的丢失最小化，质粒必须在重组率低的大肠杆菌菌株（*E. coli*）里大量复制。我们建议质粒 DNA 在 Stbl2 细胞系（Invitrogen）中大量复制。含有 MBS 的重组质粒在细菌中发生复制后，用限制性内切核酸酶图谱分析的方法来验证 MBS 的完整性。如果构建物丢失了部分重复序列，原始的重组质粒的 DNA 必须被重新转入细菌，通过图谱显示不同的克隆来找到表达完整数目 MBS 的载体。

含有不同数目的 MBS 的重组质粒是构建 MBS 的好的来源。Singer 实验室构建了 3 种质粒分别表达 6、12 和 24 重复序列的 MBS 茎-环结构（分别表示为 pSL-MS2-6X、pSL-MS2-12X、pSL-MS2-24X)，并且能被限制性内切核酸酶 *Bam*HI/*Bgl*II 消化（http://www.singerlab.org/requests/）。把这个重复序列作为 *Bam*HI/*Bgl*II 片段克隆到 *Bam*HI 位点，可以用简单的限制酶酶切消化来验证插入的方向。另外，方向错误的插

入的 MBS 框可以作为好的阴性对照。如果需要不同的限制酶酶切位点，就可以采用重复序列外侧的序列作为引物，用聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）的方法来扩增该重复序列。若采用参照重复序列内部的核苷酸设计的引物将会与 24 个 MBS 发生退火，便不可能产生全长的产物。PCR 产物可能是有问题的，既然重复序列相互间会发生退火以致很难获得全长产物。采用 Platinum *Pfx* DNA 聚合酶（Invitrogen）可以使 PCR 很好地扩增 MBS。另外 PCR 循环中高的退火温度也能够避免发生非特异性的引物退火。

在含有 MBS 的 mRNA 报告基因构建完成后，可以设计针对 MBS 和 mRNA 的特异性探针通过 Northern blotting 分析来检验正确的报告基因在实验细胞中的表达，另外也可以设计 MBS 的探针以 FISH 的方法来验证表达。在 Singer 实验室的网站上可以找到简单的 FISH 的实验方案（http://www.singerlab.org/protocols/）。

## MCP-xFP 的表达

利用 MS2 系统达到检测单个基因转录的关键步骤是确保有适当表达水平的 MCP-xCP 融合蛋白。MCP 在质粒中编码然后转染到细胞（短暂地或稳定地）。组成型启动子[巨细胞病毒（CMV）或哺乳动物的 RNA 聚合酶 II（pol II）] 可以控制 MCP 的表达。然而研究者可以改造诱导型的或组织特异的启动子，使其适用于时间或细胞特异性的表达。当插入 MBS 的报告基因和 MCP-xCP 质粒在细胞里共同表达，在任何时候都只有一小部分的 MCP-xCP 融合蛋白会结合到 MBS 标签的 mRNA，而大部分 MCP-xCP 融合蛋白都游离在细胞里。这就带来了一个严重的信噪比问题。为了保证游离的 MCP-xCP 的荧光不会掩盖 mRNA-MCP-xCP 的信号，研究者必须谨慎地控制 MCP-xCP 融合蛋白的表达水平。方法之一是改变表达水平，之二就是把游离的 MCP-xCP 选择性地隔离到细胞内不会被成像的某一区域。

在细胞中表达 MCP-xCP 有两种方法：细胞质中或细胞核内表达，各有优点。选择哪一种方法视实验要解决的具体问题而定。表 10-3 列出了一系列可供选择的 MCP-xCP 构建物，其中部分含核定位信号（nuclear localization signal，NLS），而另外的则没有。当研究 mRNA 在细胞质中的定位和动态过程的时候，应采用 MCP-xCP 和 NLS 的融合子。定位在细胞核内的 MCP-xCP-NLS 与新转录的报告 mRNA 结合后，被转运到细胞质。把游离的 MCP-xCP 隔离在细胞核会大大降低细胞质中的背景荧光，从而便于胞浆中单个 mRNA 的检测。

当需要同时对细胞核和胞浆里发生的事件进行成像时，应采用不含 NLS 的 MCP-xCP。该融合子足够小以致能扩散进入细胞核，从而使得其在细胞核和细胞质里的表达水平相当均一。核内的事件，诸如转录的动态过程、mRNA 的移动，都能在良好的信噪比下被监测。在细胞质中游离的 MCP-xCP 会导致很高的背景荧光，并给单分子的研究带来困难。调整表达水平可以帮助降低背景信号。然而，如果 MCP-xCP 的表达水平过低，研究者又不能使 mRNA 上的所有 MBS 都结合上 MCP-xCP 融合蛋白，这会最终影响转录的检测。此外，过高的表达会带来很强的背景荧光，导致很难达到单个转录这一分辨率。确定合适的 MCP-xCP 的表达水平将是一项有难度、又耗时的工作。下面的章节将为如何优化 MS2 系统以应用于单分子成像和设计最佳的活细胞单分子检测的成

像系统提供一些建议。

细胞内动态过程的活细胞的单分子成像要求精确地设计成像系统，需要自动化的设备来获取高质量的图片。当该系统迅速捕捉图像以实现高时间分辨率地记录细胞内动态事件时，该系统应足够灵敏以获取高质量的图片（高信噪比）。实际上，成像众多相关因素中优化其中之一时往往伴随着另一因素的牺牲。例如，在足够信噪比下的单分子的灵敏检测往往要求在较小的获取速率下保证尽可能长的曝光时间，这势必影响到时间分辨率。当优化 SNR 的时候，不仅影响时间分辨率，而光毒性也会影响细胞的状态和活性。因此我们建议研究者要在认真考虑哪些参数对于成像实验是最重要的基础上来搭建成像系统。活细胞成像要求研究者在维持细胞的完整性和尽可能以足够快的速度获取高质量图像这二者之间找到好的平衡，才能实现精确地记录细胞内动态事件。这里，我们重点介绍能够按照研究者需求被优化的这种成像系统的基本组成。

## 活细胞成像系统的基本配置

图 10-3 和表 10-2 分别显示和列出了基本部件。

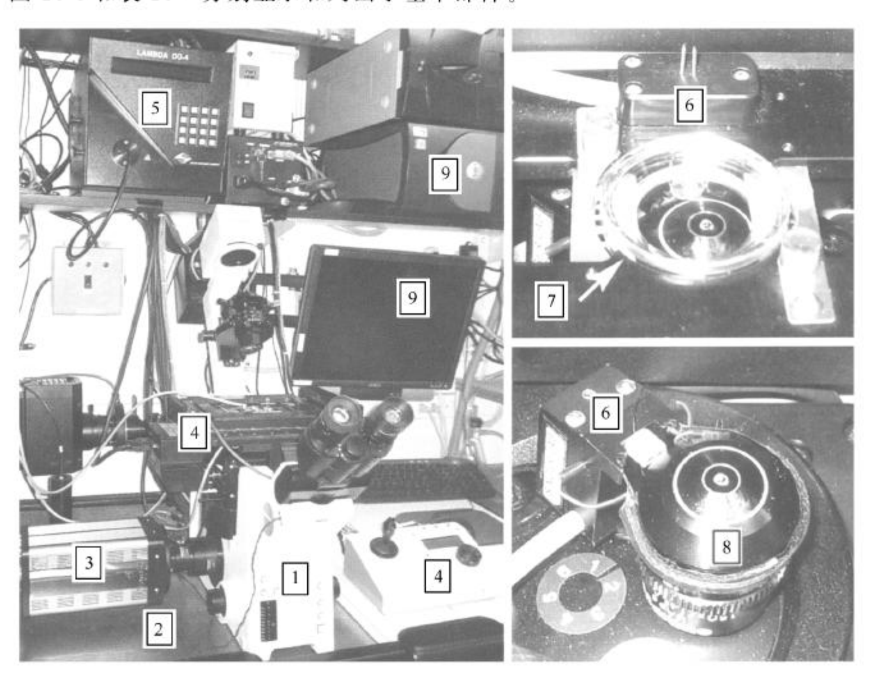



图 10-3　单分子荧光活细胞成像的显微镜装置示意图。（左图）全自动显微镜系统，其底座包括内置自动聚焦系统（1）；防震台（2）；超敏感快速相机（3）；载物台 *XYZ* 定位（4）；可调光源（5）；多功能软件包（9），可控制硬件设备及数据采集。（右上图）Delta T 培养皿系统（Bioptechs, Inc., Butler, Pennsylvania）显示了玻璃底部的培养皿（7）牢固地定位在带温控的镜台样本架（6）上。（右下图）高放大倍数和大数值孔径的物镜（8）与其物镜加热器（6）显示在一起。

表 10-2　自动显微镜成像系统的组成

| 显微镜系统特性 | | 举例[a] | 制造商 |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 倒置显微镜镜台 | IX81 | Olympus (Center Valley, Pennsylvania) |
| 2 | 防震台 | 63-500 实验台 | Technical Manufacturing Corporation (Peabody, Massachusetts) |
| 3 | 超灵敏相机 | Cascade II 512 EMCCD (16μm/像素) | Photometrics (Tuscon, Arizona) |
| 4 | 轴定位控制器 | MS-2000-XYLE-PZ | Applied Scientific Instruments Inc. (Eugene, Oregon) |
| 5 | 可调谐激发光源 | Lambda DG4/OF30 | Sutter Instruments, Inc. (Novato, California) |
| 6 | 温度调节 | 样本/载物台:Delta T 温度控制器<br>物镜:物镜加热控制器 | Bioptechs Inc. (Butler, Pennsylvania) |
| 7 | 样本槽 | Delta T 玻璃底培养皿 | Bioptechs Inc. |
| 8 | 高 NA 物镜 | U Aprochromat 150x<br>TIRFM, NA 1.45 | Olympus |
| 9 | 数据采集软件 | IP Lab<br>SlideBook | Scanalytics Inc. Rockville, Maryland Intelligent<br>Imaging Innovations (Denver, Colorado) |
| **可选择的设备** | | | |
| 10 | 自动聚焦 | Built-in: IX81-ZDC<br>Retrofit: CRIFF-2000 | Olympus<br>Applied Scientific Instruments Inc. |
| 11 | 高速快门 | Lambda DG4和 DG5 | Sutter Instruments, Inc. |
| 12 | 自动载物台($x$、$y$ 和 $z$ 轴定位) | $x$,$y$(和可选择的 $z$)自动伺服载物台(MS-2000)及集成线性编码器(800-706-2284)的控制器,可实现更精确的重现 | Applied Scientific Instruments Inc. |
| 13 | 多通道成像设备 | 双分光器 FW-1000高速滤光片转轮 | Photometrics Applied Scientific Instruments Inc. |
| 14 | 数字微镜阵列 | 数字镶嵌光阑系统 | Photonic Instruments (St Charles, Illinois) |

[a] 参见图 10-3。

1. 马达驱动的倒置显微镜。一个理想的成像系统应该具备稳定的、自动的倒置显微镜，并有多个端口可以允许其他外部设备的连接。该显微镜能自动聚焦、载物台可移动调节、快门释放、滤色片可调节。马达控制的载物台与其辅助自动设备对实现多个波长的不同时相的活细胞的动态观察是关键的。

2. 防震台。气垫式的防震平台可使成像系统免受外界不稳定因素的干扰。当检测和追踪活细胞内小颗粒的时候，防震台可保证更好的分辨率，它在单分子成像中起关键作用。防震台越大越厚，隔震效果越好。

3. 超灵敏的相机。这也是其中最重要的一个元件。电子倍增电荷偶联设备探测器(electron-multiplying charge-coupled device, EMCCD) 可进一步消除输出噪声，有更

高的敏感性，有更高的图像采集速度（每秒可达500帧）。而相比之下普通的CCD相机则更普遍地应用于一般的荧光显微镜。

4. 高精度、快速（$z$轴）的调焦控制。一个高速服务器或压电式驱动的目镜或载物台或显微镜的一个内置马达驱动的 $z$ 轴控制器可实现精确的轴向定位。这对于校正焦点漂移（参考另外的辅助设备）、测量轴向区域以及以一定步距沿轴向对样本进行分层扫描以得到一组光学切片，然后能被转换和进行三维立体图像重建这几项工作都非常重要。

5. 可调谐的激发光光源。活细胞对激发光的波长和强度很敏感。中性密度（neutral density，ND）滤光片被放置在光源和样本之间以削弱光的强度，紫外照射具有高度破坏性，因此要通过玻璃滤光片或用一个发较弱紫外光的灯，如一台氙弧灯来照明以削弱光的强度。在更大范围的成像及后续的荧光定量分析中，当选择光源，尤其是在用超敏感的相机检测的时候，成像范围的均一照度和输出功率的稳定性要被重点考虑。可通过把光源放置在离开显微镜工作台的位置来削弱激发光的温度波动噪声。可用液体或晶体的光导来连接光和显微镜，并且它能均化光以使成像范围有均一的照度，从而消除由汞弧灯产生的“热点”。其他可供选择的光源还有激光、单色光以及电流控制设备。这些能产生特定波长的光，在不同波长间迅速切换，并能快速地过滤和减光。

6. 温度调节。许多活细胞的实验都要求把温度恒定地控制在室温之上。温度控制设备被放置在载物台和物镜设备上，它能最有效地分散样本的热量和帮助维持焦点。一个有机玻璃盒子可以安装在载物台和物镜周围。热稳定物镜的轴向位置可帮助解决焦点漂移问题，使样本免受气流和声音振动的影响。除了温度控制之外，该盒子里还能使活细胞成像中的两个重要因素适当浓度的 $CO_2$ 和湿度，维持在一定水平。

7. 样本或成像的培养皿。活细胞可在开放或闭合的培养皿系统中进行成像，具体视实验细胞、实验设计和成像目的而定。开放系统使用最为简便，因为细胞的生长和成像可在同一个培养皿中进行。然而，由于培养基暴露在pH和摩尔渗透压浓度时常变化的外环境中，开放系统并不利于细胞的最佳生长状态。封闭系统则能避免环境引起的变化，因此是较好的选择，当连接了灌流室后，在样本成像过程中可不丢失轴向位置而随意进行缓冲液的更换。

8. 大数值孔径（high-numerical-aperture，NA）的物镜。一个大数值孔径的物镜（1.4或更大）能提高图像的质量和分辨率，并从样本采集更多的光。一些大数值孔径物镜支持更进一步的成像应用，如光活化、解笼锁、全内荧光反射（total internal reflection fluorescence，TIRF）、UV照射以及红外（infrared，IR）成像，当选择物镜的时候应考虑其在这些方面的应用。

9. 图像获取和分析软件。软件必须在显微镜、相机和需要自动化的外部设备之间能兼容。计算机要有一个快速微处理机、一个大的随机存储器、大的硬盘容量。IPLab（Scanalytics，Inc.，Rockville，Maryland）和 SlideBook（Intellige Imaging Innovations，Denver，Colorado）是图像获取和分析的比较好的软件。当需要进一步脱机数据处理时，Imaris（Bitplane Inc.，St. Paul，Minnesota）、Huygens Professional（Scientific Volume Imaging，Hilversum，The Netherlands）和 MetaMorph（Molecular Devices，Sunnyvale，California）对于三维（three-dimensional，3D）空间再现、重叠或目标追踪

则具备更优异的分析性能。另外，美国国家卫生中心（National Institutes of Health，NIH）提供了一个免费的基于 Java 语言的软件包，ImageJ（以前是 NIH image）也是一个好的数据分析工具（http://rsb.info.nih.gov/ij/）。

### 活细胞成像的辅助设备

多个成像设备的自动化和数字同步化大大减少了图像获取所需的时间，意味着获取高质量数据的可能性大大增加。然而，如果需要添加下列部分设备来大大改进单颗粒活细胞成像，由于高度精密的设备、外部硬件设备以及合适的软件的协调工作的复杂性，实验室或其他设施应该有足够的专业人士来操作这一系统，以防有误。表 10-2 列了一部分可用于成像系统的设备。

1. 自动聚焦装置。自动聚焦装置 [如配备零漂移自动校正装置（Zero Drift Compensator，ZDC）的 Olympus IX81-ZDC 或 Nikon TE2000-PFS] 以及 CRIFF-2000 连续内反射反馈聚焦系统（应用于科学仪器），大大提升了从长时相记录中采集到的图像的质量。

2. 高速电化学光闸。光闸用来阻止激光，控制细胞在激光下的持续暴露。这有利于减少光漂白的量并削弱光毒性给细胞带来的损伤。在长时间成像过程中多个波长的激光来源之间可以迅速切换，如激光束和传输的光。

3. 自动显微镜平台。在对多个视场进行成像或在长时序成像中观察多个视野的时候，通过精确的 $x$、$y$ 和 $z$ 轴定位则可以回到某一特定的位置，并且一个微动步进马达可以自动调节 $z$ 轴，可逐层扫描样本培养皿或样本切片中的多个细胞获得多层情况，实现三维和四维（一定时间下的三维图）成像。

4. 多通道成像设备。活细胞成像技术面临的一个难题是如何同时从多个波长中迅速地捕捉数据。双波长分光器或双相机（Photometrics，Tucson，Arizona）可实现不需要调节滤光片而进行多波长同时成像。在长时序成像实验中，这增加了好的时间分辨率，但成像视场则受到限制。当需要观察整个视场的时候，可以使用外置的自动滤光片转轮；然而时间分辨率相对较小。2 和 3 滤光棱镜可放置在显微镜的转盘来选择激发光的波长，外置的滤光片转轮可迅速地在多个滤光片之间切换。一旦在已有系统上添加多通道成像设备，确定维持聚焦平面，发射光可正确地聚焦在相机上。但多通道成像设备也会带来光学像差和波长干扰。

5. 数字微镜器件（digital micro mirror device，DMD）。DMD 是一个光学半导体元件，通过电动控制光路在镜中的倾斜角来调节激发光。这实现了更加精确地控制激发光的强度、空间方位以及入射光的角度。该元件对细胞内小范围进行漂白和解笼锁，以及调节宽视场照明时的光强度。

## 哺乳动物细胞中 MS2 系统的应用

在单分子检测过程中，MBS 报告基因和的成功设计、克隆和共表达是获得最好灵敏性所必需的。正如在前言部分提到的，MS2 系统包括两种遗传编码的部分：包含数个 MBS 茎-环结构的报告 mRNA 及与该位点有高亲和力的荧光 MS2 外壳蛋白，从而使

细胞内的 mRNA 带上荧光。接下来我们将简要概括质粒设计、克隆和转染两个构建物到哺乳动物细胞系的过程。

## 报告 mRNA 表达水平的调节

在高级真核细胞里，很多因素可以实现报告 mRNA 最优表达水平的调节，其中包括起始表达的启动子的选择。CMV 启动子和 Rous sarcoma 病毒（RSV）长末端重复序列在多种细胞里能实现报告 mRNA 高表达。然而，某些具体实验可能会要求报告 mRNA 的表达是短暂的、弱的、组织特异的、基因特异的或者诱导型的启动子。为了在 COS-7 细胞里对单个 mRNA 核糖体颗粒成像，Fusco 等（2003）采用 RSV 启动子起始报告基因的表达，该基因的 LacZ 编码区和 β-肌动蛋白的 3′UTR 之间插入了 24 个 MBS（pRSV-Z-MS2X24-β actin）。一套 SV40（猿猴病毒 40）的多聚腺苷酸位点插入到 β-肌动蛋白的 3′UTR 的下游来终止转录。

## MCP-xFP 表达水平的调节

如上所述，为了实现单分子检测，必须谨慎调节 MCP-xFP 在细胞里的表达水平，因为过表达后未结合的 MCP-xFP 会带来高的荧光背景。我们在几种哺乳动物细胞里采用了来自 CMV、RSV 和聚合酶 II 大亚基的启动子。在原代培养的成纤维细胞和 COS-7 细胞里，分别由 RSV 和聚合酶 II 大亚基启动子起始了 MCP-xFP 的理想表达。然而，我们发现由于 CMV 启动子太强而引起高背景和细胞毒性，因此它不适用于单分子的可靠检测。

## MCP-xFP 在细胞亚结构中的定位

可以采用把未结合的 MCP-xFP 定位在细胞核这一手段来准确决定胞浆中 MCP-xFP 的水平。把来自 SV40 大 T 抗原的 NLS 克隆在 GFP 后（pMS2-GFP-NLS）可以促进胞浆中单个 mRNA 分子的检测（Bertrand et al. 1998；Fusco et al. 2003）。

## 转染报告 mRNA 质粒和 MCP-xFP 质粒

正如前面提到的，在细胞里共转报告 mRNA 质粒和 MCP-xFP-NLS 质粒来使二者同时表达。二者表达后，未结合的 MCP-xFP-NLS 滞留在细胞核里，结合了报告 mRNA 的 MCP-xFP-NLS 则留在细胞质。由此带来的高信噪比实现了单个 mRNA 的检测。

许多方法可以提高哺乳动物细胞的质粒 DNA 转染效率。我们已经成功地采用磷酸钙沉淀、电穿孔（Shav-Tal et al. 2005）、核转染（Amaxa Inc.，Gaithersburg，Maryland）、FuGENE 6（Roche Diagnostics Corp.）、脂质体 2000（Invitrogen），以及慢病毒转染的方法来转染多种哺乳动物细胞。对于每一类哺乳动物细胞，转染方法都应该被优化。实验方案 1 描述了用磷酸钙共沉淀方法来把 pRSV-Z-24MBS-β-actin 和 pPolII-MCP-GFP-NLS 共转到 COS-7 细胞。

## 选择细胞类型

COS-7 细胞是猴肾成纤维细胞经 SV40 病毒基因转化的细胞系（ATCCCRL-1651），

由于其光学特性而被选用。其扁平的形态可能弱化那些干扰单分子检测的焦点外的光，另外该细胞在塑料或玻璃上的黏附也不需要细胞外基质的参与。

## 图像采集

获取高质量的图像对于以后的成像分析很关键。目的是在维持细胞存活的同时，获取大范围内动态的、高信噪比、高时间分辨率的图像来精确追踪移动的颗粒。往往为了优化其他参数要牺牲其中之一。在此，颗粒的检测是我们的目的，我们将详述高信噪比、适中时间分辨率的图像获取。在以尽可能高的速度来获取图像的时候，相机需要收集尽可能多的荧光，因此整个成像系统中最关键的元件就是相机，EMCCD 在保证高帧频率的同时提供高的敏感性，因此可以满足多维成像［4D 和 5D（一定时间下多个波长的三维图)］的这些需求。在确立了单分子检测的可靠性和灵敏度后可以验证快速图像捕获的速率（参见以下，单个 mRNA 转录的图像分析）。

活细胞单分子事件的检测和捕捉技术已经大大改进，在捕获图像过程中必须维持细胞处于良好的存活状态。细胞对外部环境极其敏感，对引起应激反应或细胞凋亡的外界变化能做出迅速反应。影响细胞存活的主要环境因素有温度、pH、湿度、自由基的产生以及光毒性。Swedlow 等（2005）很好地讨论了如何最优化活细胞成像。

实验方案 1 列出了采用 Bioptechs Delta T 培养皿系统（Bioptechs Inc.，Bulter，Pennsylavania）来进行活细胞单个 mRNA 分子成像的步骤。该技术尤其适用于活细胞成像过程中需要准确控制细胞温度这一情况。为 Delta T 培养皿特别设计的载物台加热器和温度控制单元构成的热反应回馈环路系统可以实现温度的精确调节（图 10-3 的 No. 6）。我们在短时间（≤1 h）的实验中采用开放的培养皿系统，培养基含 Leibovitz's L15 HEPES，上面覆盖矿物油来防止液化及湿度的改变。在酵母系统中，则采用另一种合适的培养基（参见下面，培养基和培养条件）。如果对一个封闭腔系统进行成像，我们建议采用 Bioptechs 的密闭式活细胞观察及灌流系统（Focht Chamber System，FCS2）。

## MS2 系统在酵母细胞中的应用

酿酒酵母（*S. cerevisiae*）是一种极其有效的遗传系统，是研究基本生物学过程的理想模式系统。1998 年 Bertrand 等发展了 MS2 系统并第一次应用在酵母（Bertrand et al. 1998）。目前酵母仍是被使用的模式系统，因此在这我们将描述如何在酵母中应用 MS2 系统。在酵母中进行带标签 MS2 的 mRNA 成像和在其他哺乳动物细胞中的成像相差并不大，但必须考虑到一些酵母特异的因素。

在酵母菌株里导入或缺失目标基因的方法比较简单，但是对这些酵母菌株进行成像却比较困难。主要是因为酵母细胞与哺乳动物细胞相比，其细胞核较小。酵母细胞单倍体的细胞核的直径小于 2 μm，因此合适的光学组件和相机显得尤为重要，相机的像素大小要接近酵母的细胞核的大小。至少要使用 100 倍的物镜（NA≥1.4），相机的像素尺寸要尽可能小。高放大倍数的物镜（Olympus 150×1.45 NA TIRF）是一个理想的

选择，它允许使用更大像素尺寸的相机。这些相机往往有更快的读出次数，从而利于好的时间分辨率下追踪单分子。

和哺乳动物细胞一样，表达适当水平的 MCP-xFP 融合蛋白是决定实验成功与否的第一步。我们将描述几种可行的不同的 MCP-xFP 构建载体，主要是最初被用于导入 MS2 系统的构建载体。

## 酵母中表达 MCP-xFP

表达有或无 NLS 的 MCP-xFP 的载体可以被采用，主要视实验研究的 mRNA 表达的哪一步骤而定（参见上文）。表 10-3 列明了酵母中 MCP-xFP 表达载体的几个选择。

**表 10-3 MCP-xFP 融合蛋白的表达载体**

| 载体 | MCP-fusion | 启动子 | 种属 | 选择性 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| pMS2-GFP-NLS | MCP-GFP-NLS | pol II | 哺乳动物 | Kan/Neo | Fusco et al. (2003) |
| GFP-MS2-1xNLS | GFP-MCP-1xNLS | CMV | 哺乳动物 | Kan/Neo | Dynes and Steward (2007) |
| bNLS-GFP-MS2 | bNLS-GFP-MCP[a] | CMV | 哺乳动物 | Kan/Neo | Dynes and Steward (2007) |
| K89 | GFP-NLS-MCP | CMV | 哺乳动物 | Kan/Neo | Bi et al. (2003) |
| pCaS-*Phsp83*-MCP-GFP/RFP-tubulin 3′UTR | NLS-MCP-GFP/RFP with the α-tubulin 3′UTR | Hsp83 | 果蝇 | | Forrest and Gavis (2003); Weil et al. (2006) |
| pDEXH 82 MS2-GFP | MCP-GFP | 盘基网柄菌 actin 15 | 盘基网柄菌 | Blasticidin | Chubb et al. (2006) |
| pG14-MS2-GFP | NLS-MCP-GFP | GDP | 酿酒酵母 | *ampR*, *LEU*, 2 μm | Bertrand et al. (1998) |
| pCP-GFP | GFP-MCP | MET25 | 酿酒酵母 | *ampR*, *HIS*, CEN | Beach et al. (1999) |

[a] Bitartate NLS 来自爪蟾核质蛋白。

pG14-MS2-GFP 载体由于很强的三磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GPD）基因的启动子而组成型地表达 NLS-MS2-GFP，并使 MCP-GFP 高度聚集在细胞核内（Bertrand et al. 1998）。pCP-GFP 载体表达不含 NLS 序列的 MCP-GFP 融合蛋白则使 MCP-GFP 分布在全细胞。正如上面所讨论的，在 mRNA 的信号受到监测的亚细胞结构里表达 MS2-GFP 融合蛋白使得很难检测单个 GFP 标签的 mRNA，因此有必要谨慎确定 GFP 的量。为了使 GFP 有不同的表达水平，可采用诱导型的 MET25 启动子来起始 MCP-GFP 融合蛋白的表达。当酵母菌株在含有蛋氨酸的培养基中生长时，表达被抑制；一旦更换到不含蛋氨酸的培养基，表达被诱导。根据在不含蛋氨酸的培养基中生长时间的不同可诱导表达出不同量的融合蛋白。因此，不含蛋氨

酸的培养基的短时诱导可产生低浓度的 MCP-GFP。

### 菌株构建

这里将略过酵母生长和基因改造的必需的基本知识。*Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* 可以作为基本的酵母基因改造的好的实验手册（Amberg et al. 2005）。在互联网上也能搜索到许多其他实验方案。在 http://www.yeastgenome.org/网站可以收集一些有用的链接。

### 培养基和生长条件

和哺乳动物细胞一样，酵母在合适的条件下生长这一点很关键。很多因素会导致细胞自身荧光很强，使得它们不适用于这里所说的研究。细胞应该被培养在最低限要求的培养基里，因为 YPD 培养基会造成自身荧光。此外，高密度的酵母细胞生长（$OD_{600}$ > 1.5）也会引起自身荧光。对于较老的细胞，最好先培养 2 d（预培养和成像培养，见实验方案 2），丢弃其中的空胞和其他内容物。*ADE1* 和 *ADE2* 基因突变的酵母菌株不可被使用，因为这些细胞会积聚可能增加自身荧光的色素。实验方案 2 用 6 个 MS2 重复序列（6MBS）标签的 *ASH1* mRNA 来使 *ASH1* mRNA 颗粒的定位在单倍体酵母细胞的芽的尖端（见图 10-1，见图版）。

## 单 mRNA 转录物的成像分析

### GFP 荧光定量

参照 FEMINO 等（1998，2003）和 Fusco 等（2003）的方法来进行 GFP 的单分子测量。首先通过成像一系列稀释的纯化的增强 GFP（enhanced GFP，EGFP）决定一个特定体积内的总荧光强度（total fluorescence intensity，TFI）来计算每个 mRNA 分子的 TFI。然后用每个 GFP 分子在给定像素下的荧光强度的校正曲线来决定成像样本中 GFP 分子的数目。因此收集同一天在同样的设备、同样的相机设置和图像获取参数下成像的细胞的缩微图和确定校正曲线很重要。详细如下。

- 用纯化的重组 EGFP（或其他变体）来校正荧光信号。采用同样的相机捕获、像素组合、偏移，以及成像条件（暴露时间、温度等）对校正样本或标本很关键。
- 在固定的细胞上检测单个 mRNA 分子。测量每个 mRNA 粒子的 TFI。用根据纯化的 EGFP 建立的校正曲线可以确定单分子的敏感性。
- 在活细胞里检测单分子。一旦在固定的细胞上实现了好的信噪比的单个 mRNA 检测，可以进一步在活细胞上对其进行成像。

### 绘制 GFP 校正曲线

实验方案 3 描写了绘制 GFP 校正曲线的方法。Excel 表和 Shav-Tal 等（2005）介绍的方法可以用来参考 GFP 校正曲线的绘制和帮助计算单分子的 GFP 荧光。

### 确定被转染的细胞里 mRNA 分子的数目

同样的成像参数和系统组成下得到的被转染细胞的图像在重组 GFP（recombinant GFP，rGFP）校正曲线的绘制中使用到。正如实验方案 3 所写，在甲醛固定的细胞中观察单个 mRNA 分子能否被检测后，可以试图在活细胞中追踪单个粒子。Fusco 等（2003）用这一方法证实了带有 24 个 MBS 的一个 mRNA 颗粒结合了平均 33 个分子的 MCP-GFP。这个数值还可能低估了实际结合的 GFP-MCP，因为理论上 48 个 GFP 分子可结合 24MBS 重复序列，形成 24 个 MCP-GFP 二聚体。

### 在活细胞中检测单分子

在采集到的长时序的视频里可以发现很多含 MCP-GFP 的颗粒是移动的。选择其中显示目标粒子的一帧，用固定细胞中的计算方法来计算其 TFI。绘制荧光颗粒在这个过程中的漂白曲线作为对照，这样使得在单分子荧光的确定中考虑到光漂白的程度。

### 追踪单个 mRNA 颗粒

许多好的十进位计数法可用于目标检测、重心分配以及作为时间函数（Thompson et al. 2002；Gennerich and Schild 2005），它能允许一次检测和追踪多个粒子。这些程序能区分扩散的运动，阐明颗粒的轨迹在衍射受限的颗粒重心的正方形区域的基础上是非扩散的。ImageJ 的粒子追踪插件（多个轨迹及粒子追踪）在 NIH 网站（http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins）上可以免费获得。基于软件的分析系统追踪多条路径并相当迅速地分析它们的运动。然而，活细胞内粒子运动是很复杂的，这些系统可能弄错或遗漏肉眼能看到的路径。因此，对于软件确定的粒子和追踪，实验者应该再执行肉眼检查。

动态粒子的许多参数可以被测量，如（并不限于）扩散或直线运动、速度、在亚细胞结构中的定位（Fusco et al. 2003）。在这我们说明如何用简单的软件程序分析细胞内颗粒的动态性。

### 显示粒子轨道

从一个动态视频中一帧一帧地确定并记录 mRNA 粒子的中心这是一项既枯燥又耗时的工作。当所有点的最大荧光强度（maximum fluorescence intensity，MFI）显示在同一图像中时轨迹很容易被反映出来。从 MFI 图像可进一步得到波动曲线，这是把目标轨迹表示为时间的函数的一个方法。通过计算波动曲线的斜率可以得到粒子的速度。实验方案 4 里介绍了 ImageJ 软件工具可以来执行最大强度投影和波动曲线的产生。图 10-4 显示了在活细胞里分析 MCP-GFP β-肌动蛋白 3′UTR mRNA 粒子随时间改变的运动（参见 Wells et al. 2007）。

ImageJ 插件可以被下载，它简要概括了下面几个操作步骤。简单地说，选择“分割线选择”来追踪显示在 MAX INTENSITY 图像 $z$ 轴投射窗的粒子路径。记录用线条工具特化的路径的坐标系来计算粒子的平均和瞬间速率。

线的斜率随粒子的平均速率而改变。从波动曲线显示图中可以容易地检测出方向的改变，正如静止的粒子（图 10-4，底端，见图版）。移动的粒子会有一个不为零的斜

率。对定向的、运动受限的、扩散的和静止的粒子进行可视化观察和定量（Fusco et al. 2003）是较简便的。

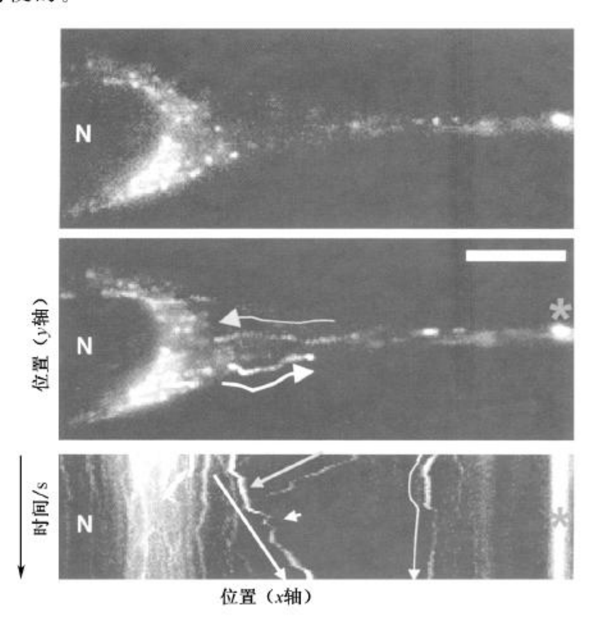



图 10-4 mRNA 粒子在共转 MCP-GFP-NLS 及 RSV-LacZ-β actin 3′UTR（报告 RNA）质粒的细胞里呈现多种动态运动。（上图）采集到的连续视频里的一幅静止的图像（参见 Wells et al. 2007）显示培养的哺乳动物成肌细胞里 MCP-GFP 与含 mRNA 的 β-肌动蛋白 3′UTR 的结合。（中图）MCP-GFP 粒子轨迹的最大强度投影（总时间＝1 min）。箭头表示粒子运动的方向。（下图）粒子轨迹的波动曲线，$y$ 轴为从上到下递增的时间，$x$ 轴位置随 $y$ 轴的时间改变。斜率特征表明粒子呈非扩散运动。（红色星号）没有速率的静止的粒子（直线）。（黄色箭头）非均一方向运动的粒子，速率为 0.15 μm/s，最大瞬间速率为 1.52 μm/s（白色箭头所示）。（绿色箭头）直线运动的粒子，平均速度为 0.45 μm/s。（蓝色箭头）粒子在一个固定的点周围闪烁，称其为“受限”（corralled）运动。N 代表细胞核，标尺长度为 10 μm。

## 结论

更快、更敏感的成像技术及在体荧光生物标记物的共同进展已经大大推动了当今细胞成像手段的进步。MS2-GFP 标签系统是一个强有力的工具，它允许我们追踪一个 mRNA 分子经历从转录位置发生到降解小体里的降解这整个过程。该系统使我们可以记录一个 mRNA 分子在全细胞里的移动路径。结合 MS2 系统和其他新的成像技术，如可以标记新合成蛋白的 FLAsH/ReAsH 系统（Gaietta et al. 2002; Rodriguez et al. 2006），在不久的将来可能实现实时追踪基因表达的全部途径。这反过来为生理条件下实时调节全部的或亚结构的蛋白质翻译、转运及信号转导事件提供可能。

# 实验方案 1：报告 mRNA 和 MCP-xFP 质粒转染 COS-7 细胞及荧光颗粒的图像获取

该实验方案将报告 RNA（如 pRSV-Z-24 MBS-β actin）和 MCP-xFP（如 pPolII-MCP-GFP-NLS）质粒用磷酸钙沉淀的方法转染入 COS-7 细胞，也描述了用 Delta T 系统进行细胞内荧光颗粒的图像捕获。

## 材料

### 试剂

磷酸钙转染试剂盒（Invitrogen）

供体 DNA（如鲑鱼精 DNA）

COS-7 细胞（37℃，5% $CO_2$ 的培养箱）

细胞外基质（extracellular matrix，ECM）分子，如胶原、纤连蛋白、基质胶（BD Biosciences，San Jose，California）（可选择的，参见步骤 1）

COS-7 细胞的培养液：Dulbecco's 改良的 Eagle 的培养液（DMEM），含 10% 的优级胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）

此外，也可以采用 Leibovitz's L-15 培养液，尤其对活细胞成像（参见步骤 4）。

MCP-xFP 质粒（如 pPolII-MCP-GFP-NLS）

矿物油

报告 RNA（如 pRSV-Z-24 MBS-β actin）

### 设备

电子倍增电荷耦合器件（EMCCD）相机

荧光显微镜及部件

适用于活细胞成像的玻璃盖玻片或底端为玻璃的培养皿（如 Delta T 培养皿、Bioptechs Inc.，Butler，Pennsylvania）

Delta T 培养皿是开放的成像系统，可配合使用 Delta T 温度控制器。由黑色不透光的聚苯乙烯制成的 Delta T 培养皿可以对成像小槽进行遮光。如果不需要控制温度，也可使用该培养皿，其玻璃成像表面没有传导温度的薄膜包被。

培养箱设定在 37℃，5% $CO_2$。

## 方法

### 转染 COS-7 细胞

1. 用 10% FBS 的 DMEM 培养液以 30%～50% 的细胞密度把 COS-7 细胞平铺在适用于活细胞成像的玻璃盖玻片或底端为玻璃的培养皿上。于 5% $CO_2$ 的 37℃ 温箱孵育过

夜。添加可易化细胞黏附的 ECM 分子。

2. 第二天，用磷酸钙转染试剂盒（Invitrogen）转染报告质粒和 MCP-xFP 质粒。依照产品说明书，将磷酸钙-DNA 悬液转移至上述 COS-7 细胞的细胞培养基中。孵育过夜。

   通过调整报告 RNA 和 MCP-xFP 质粒的不同比值来确定最佳转染效率。最初加入 5 μg的每一种质粒和 5 μg 的非特异的供体 DNA（如鲑鱼精 DNA）。供体 DNA 的加入将大大提高转染效率。

## 采用 Delta T 成像系统采集图像

3. 在成像细胞之前，开启电子设备，包括光源、温度控制器/物镜加热器、环境控制器、相机和显微镜。稳定成像系统至少 2 h。这有助于使成像过程中的噪声和 $z$ 漂移减少到最小。

4. 将 Delta T 培养皿放进设定在 37℃的 Delta T 载物台的接合位置。物镜必须和物镜加热器配合使用（图 10-3 的 No.6，左下）。当对开放培养皿成像时，如果是采用不要求 $CO_2$ 环境的培养基配制，要用矿物油或来覆盖培养基以防 pH 和渗透压发生改变。

   Leibovitz's L-15 培养基是另外一种选择，它含有 HEPES 缓冲系统而不是碳酸氢盐缓冲系统，因此可以有效地控制 pH。然而为了防止培养液的挥发最好还是添加矿物油。这对 37℃下的成像尤为关键。

   显微镜本身应该被放置在一个主机室内，并控制温度。

   如果对酵母细胞进行成像，要采用高放大倍数以及 NA≥1.4 或更高的 NA 的物镜。培养基的条件如实验方案 2 中所述。

5. 一旦已经很好地控制了细胞的温度，成像系统也已经稳定，就可以对培养皿中的荧光细胞进行扫描。

   许多被成功转染的细胞由于其核内存在过量的 MCP-xFP-NLS，所以核内荧光相当强。因此，观察这些细胞要用最小能量的激发光。低能量的激发光下一些细胞质里的 mRNA 颗粒也可以被观察到。然而，要求饱和核内 MCP-xFP 信号。

6. 对胞浆中某个区域进行长时间连续的视频采集以区分移动的粒子和静止的粒子，可以参照下面介绍的步骤。

   i. 哺乳动物细胞中 mRNA 粒子的移动速度为 1 μm/s。用 EMCCD 相机以 7～9 帧/s 的频率和 25～100 ms 的曝光时间来摄取图像。

   ii. 在较少的曝光时间下为了获得好的信噪比，可以增加入射光来照亮荧光蛋白，但要注意更强的光可能使细胞更容易遭受自由基和氧化应激带来的损伤。

   iii. 在提高图像获取速度之前，优化曝光时间、光强和细胞存活能力。

   iv. 根据预测的 mRNA 的速率，可以获取 4D 图像层，并在以后进行转换和重建。因为哺乳动物细胞里许多胞浆的事件都是快速进行的，一定时序下获取的 $z$ 轴图像对于特异性地追踪分析粒子的空间变化很有用，但时间分辨率则受到限制（参见排疑解难）。

7. 如上以及实验方案 3 和 4 中所述分析图像（单个 mRNA 转录的图像分析）。

**问题**：没有观察到被转染的细胞或转染效率很低。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 在活细胞成像条件下，部分 mRNA 粒子很难被观察到，尤其当它们活动着的时候。用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）漂洗 2 次后，用 4% 甲醛固定细胞 20 min，用 DAPI 对细胞核进行复染，然后扫描培养的细胞寻找阳性的转染细胞。
2. 采用不同的转染方法。除了磷酸钙沉淀法，下面的方法也可被成功地用来将 MCP-xFP 和报告 mRNA 共转入细胞，如电穿孔、FuGENE6、脂质体 2000、核转染和慢病毒转染。
3. 确保质粒 DNA 未被降解以及未被蛋白质污染。琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 时，跑出的带后面没有出现拖尾现象，$OD_{260}/OD_{280}$ 比值应为 1.8～2.0。如果必要的话，可用酚-氯仿抽提，去除质粒 DNA 中蛋白质的污染。
4. 将一个已知的荧光蛋白作为标志物来转染（颜色应不同于 MCP-xFP）。这将有助于找到成功转染的细胞。
5. 确定起始该转基因表达的启动子在被转染的细胞里能表达。

**问题**：细胞存活率低。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 检查质粒 DNA 的质量。内毒素的污染可能会降低细胞的存活。可以采用无内毒素的质粒 DNA 纯化试剂盒（QIAGEN），有助于提高转染效率。
2. 转染的试剂可能对细胞有毒性。采用这个转染试剂或一个没有质粒 DNA 的传递系统作为对照。
3. MCP-xFP 的高水平表达可能对细胞有毒性。可以采用下面方法来降低表达量。
   i. 把细胞表达质粒的时间从过夜减少到 4～6 h。
   ii. 转染更少的 MCP-xFP 质粒 DNA 而不改变报告质粒的数量。

**问题**：没有观察到 RNA 颗粒。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 观察所有被转染的细胞。有时候很难找到二次转染的细胞。
2. 如果报告质粒没有编码荧光蛋白产物作为一个较简便的转染标记物，则固定细胞，然后用 FISH 验证报告 mRNA 是否表达。设计用 Cy3 标记的针对非 MS2 结合位点序列（MS2-nonbinding site region，MNBS）的探针可以得到最佳的 FISH 结果，该序列邻近 MBS 茎环结构（参见http://www.singerlab.org/protocols/for pribe design，labeling，and FISH protocols for both mammalian cells and yeast）。该 MNBS 探针将会识别表达茎环结构相结合的 MCP-xFP 融合蛋白

的报告 mRNA，因此可用来检测和定量单个 mRNA 转录（参见上文，单个 mRNA 转录的成像分析）。如果在报告 mRNA 中有多个结合位点，那么 FISH 的信号将会很明显。另外，也可以采用直接针对报告 mRNA 的不包含 MBS 的序列的荧光探针。不过，结果信号可能会较弱，也可能会由于探针识别了内源性 mRNA 而非表达的外源 mRNA 导致的假阳性的结果。

3. 在 *E. coli* 中进行质粒 DNA 扩增的过程中 MBS 可能会被丢失。采用最大效率 Stbl 细胞（Invitrogen）来克隆 MBS。通过限制酶酶切消化和琼脂糖凝胶电泳的方法可以验证扩增的 DNA 是否含有 24 MBS。24 MBS 的长度约为 1.4 kb。

**问题**：背景荧光高。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 一旦表达了高水平的 MCP-xFP，会很难从高的 xFP 背景中区分出目标粒子。可以转染较少的 MCP-xFP 质粒 DNA 或在转染后早期进行成像。
2. 如果希望检测细胞质里的 mRNA 粒子，可以尝试采用 MCP-xFP-NLS 融合蛋白。如果核内 MCP-xFP-NLS 信号很强而胞浆无信号，那么可以共转更多的报告 mRNA 质粒 DNA，从而使 MCP-xFP 可以结合报告 mRNA 并从细胞核转运到细胞质。如果希望检测核内的粒子，那么可以采用没有 NLS 的 MCP-xFP。

**问题**：信噪比（SNR）较低。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 转染更多的 MCP-xFP 质粒 DNA。
2. 增加相机的增益。
3. 增加曝光时间或激发光的强度。但要注意这可能反过来影响细胞成像过程中细胞的状态和存活，也可能会减小时序视频采集的时间分辨率，甚至可能会影响粒子运动检测的准确性。
4. 我们已经成功地应用基于物镜的 TIRF 显微镜来优化活细胞中 MCP-xFP 粒子的信噪比。TIRF 显微镜只观察到最腹侧的 150～200 nm 大小的细胞。粒子可能会在隐失场内进出，这使得单个粒子的追踪变得复杂化。然而，对于小的细胞，这可能是优势。

**问题**：细胞/粒子在成像过程中没有维持在焦点。

［**步骤 6**］

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 载物台的不稳定或者无法维持稳定的轴向定位的物镜可能会引起焦点漂移。成像前开启成像系统并平衡至少 1 h，包括开启所有用来维持温度的温度控制器，从而可以谨慎控制成像系统的温度（尤其是物镜和显微镜底座的其他金属组件）。
2. 采用 ZDC/自动聚焦系统。需要安装一个压电定位设备和一个用于位置敏感的检测远红激光光源。Olympus 销售的马达驱动的 IX81 倒置显微镜，配备了 ZDC 兼容（模式 IX81-ZDC 零漂移自动聚焦系统），也可以重新改装后被添加到已有

的显微镜上。在成像过程中，ZDC 采用 735 nm 激光二极管来精确地找到样本-玻璃盖玻片界面，并准确地回到原来位置。应用科学器材公司销售的 CRIFF-2000 外置自动聚焦器件采用相似的方法来找到盖玻片-样本界面，它适用于大多数倒置显微镜，除了需要 TIRFM 物镜或贴反射膜的盖玻片的倒置显微镜。

3. $z$ 轴的系列图像叠合可以获取粒子在 $z$ 轴的波动。这有助于帮助跟踪粒子，允许实验后用加工软件对粒子运动的三维重建。然而，它需要更长的获取时间（由于需要采集更多图像），反而导致了精确度不够的速率估算以及增加了光毒性的可能性。

**问题**：光漂白的发生。

**[步骤 6]**

**解决方法**：按照下面的建议。

1. 在成像的细胞培养液里添加氧化酶和氧自由基清除系统。Oxyfluor（Oxyrase Inc.，Mansfield，Ohio）可以用来减少荧光染料的光漂白，因此适用于活细胞成像实验（Waterman-Storer et al. 1993，2000；Mikhailov and Gundersen 1995）。2 mg/ml 浓度的抗坏血酸（维生素 C）及可透过细胞的、水溶性的维生素 E 衍生物 Trolox（200 μm）（Salgo et al. 1995；Salgo and Pryor 1996）也可以作为抗荧光衰减剂。对于固定的细胞，可以采用葡萄糖氧化酶系统（Park et al. 2004）。
2. 在光路的光源和目标之间放置中性滤光片来减小激发光的强度。这需要增加每一帧的曝光时间，增加相机的增益，或者增加像素的组合来捕获更多发散的荧光。
3. 如果无法削弱激发光的强度，则可以减小每帧的曝光时间。

## 实验方案 2：MS2 系统应用在酵母细胞

该实验方案描述了采用 6 个 MS2 重复序列（6 MBS）标签的 *ASH1* mRNA 来追踪 *ASH1* mRNA 颗粒在酵母细胞芽端的定位（见图 10-1，见图版）。将 pG14-MS2-GFP 质粒和 pGAL-lacZ-MS2-ASH1 质粒转染入 W303 酵母细胞后，W303 酵母细胞生长在不含色氨酸和亮氨酸的选择性培养液里。通过加入半乳糖来诱导 RNA 表达，然后实时捕获视频。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

#### 试剂

刀豆素 A（Sigma-Aldrich）<!>
半乳糖（30%）
含 2% 葡萄糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养基
含 2% 棉籽糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养基
pG14-MS2-GFP 质粒和 pGAL-lacZ-MS2-ASH1 质粒转染酵母细胞（W303）

#### 设备

锥形瓶（250 ml）
配有合适部件的荧光显微镜
可用于活细胞成像的玻璃盖玻片或玻璃底的培养皿（如 Delta T 培养皿，Bioptechs Inc.，Bulter，Pennsylavania）
Delta T 系统提供了最好的 z 稳定性，而且容易操作。它允许实验者可以使用与哺乳动物细胞成像实验中相同的显微镜装置。
预设在 30℃的孵育箱
移液器
旋转平衡轮
振荡器（摇床）
光谱仪
锥管（50 ml）
真空吸唾器（可选择的，参见步骤 9）
旋涡混合器

### 方法

#### 接种预培养的细胞

1. 单个酵母细胞菌落接种于 50 ml 锥形管的 5 ml 含 2% 葡萄糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培

养基中。

2. 置于旋转平衡轮上 30℃孵育过夜。
3. 次日早上，取出培养的细胞，将其放置在实验台上。由于刚开始培养，所以这个时候的密度还不大（$OD_{600}<2$）。

   如果 $OD_{600}$ 太高，则可能是因为接种了太多细胞或孵育的时间过长。
4. 中午，以 1000 *g* 离心 5 min 收集细胞。
5. 加入 5 ml 含 2% 棉籽糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养液清洗细胞。
6. 重复步骤 4 和 5。
7. 加入 5 ml 含 2% 棉籽糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养液，振荡重悬细胞。测定培养细胞的 $OD_{600}$，在 250 ml 锥形瓶里用 250 ml 含 2% 棉籽糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养液把 $OD_{600}$ 稀释到 0.01。
8. 在摇床上孵育培养的细胞，200 r/min，30℃孵育过夜。

   早上，细胞应该可以用于成像实验。它们应该处在指数生长期的早期，其 $OD_{600}<1$。

## 准备成像培养皿

成像酵母细胞的一个关键步骤是要使得酵母细胞稳定地附着在培养皿的玻璃底部。为了避免在摄录实时视频的过程中，细胞发生漂移，可用植物凝集素使细胞与培养皿玻璃底部之间的非共价结合。

9. 将 500 μl 浓度为 1 μg/μl 的刀豆素 A 加入到 Delta T 培养皿，室温下孵育 5 min。用真空吸唾器或移液管吸走液体。一小薄层的刀豆素 A 将会留在玻璃上。
10. 使培养皿干燥。(放置在通风柜里加速蒸发)。之后可以马上使用培养皿，也可以存放在室温下数周。
11. 混合从步骤 8 得到的酵母细胞 40 μl 和 960 μl 含 2% 棉籽糖的 SD-亮氨酸-色氨酸培养液（预热到 30℃），加入到铺有刀豆素 A 的 Delta T 培养皿中。30℃下孵育 30 min。细胞将沉降并附着在培养皿的玻璃底部上。
12. 把 Delta T 培养皿放置在载物台上。为了避免培养液蒸发，可以在培养皿上加盖。

## 诱导表达 *ASH1* mRNA 及其长时视频定位

13. 将 300 μl 半乳糖（30%）缓慢地沿着培养皿的壁加入到培养皿中。在 10 min 内会诱导 *ASH1* mRNA 的表达。必须缓慢地加入半乳糖，这可以防止细胞分离。
14. 设定 *z* 轴步进为 0.2～0.3 μm 来捕获 4D 数据集。10 个 *z* 轴步距可以保证在图像捕获过程中粒子维持在像面中。*ASH1* mRNA 粒子是明亮的，并以 0.2～0.4 μm/s 的速度移动。为了得到更好的轨迹，有必要以最小为 3 帧/s 的速度获取图像（参见排疑解难）。

    该速度下大部分显微镜不可以进行成像，并且视频必须在单个像面中获取。这会导致许多视频的一部分帧里会遗漏在轴面移动的颗粒。为了在一段较长时间跨度里追踪粒子，就要捕获许多视频从中找到信号在聚焦点的那一帧。

实验方案 1 中提到的部分方法也适用于酵母细胞，包括光毒性、xFP 信号的漂白，*z* 轴向的稳定性以及相机设置。因此，在这一部分将说明如何解决针对酵母的实验

难点。

## 排疑解难

**问题**：没有观察到 RNA 颗粒。

**［步骤 14］**

**解决方法**：按照下面列出的几点建议。

1. 可能没有表达 GFP 或 RNA 的质粒。确保细胞总是在选择性的条件下生长。若没有选择性，则质粒会被丢失。
2. 细胞在错误的糖原下亦可生长。半乳糖的诱导作用只会在培养液中没有葡萄糖的情况下起作用。
3. RNA 表达质粒可能丢失了 MBS（参见上面，克隆报告 MBS 的构建）。

**问题**：自荧光过强。

**［步骤 14］**

**解决方法**：按照下面列出的几点建议。

1. 细胞中可能积聚了一些会导致强自荧光的代谢物。稀释细胞后让细胞至少生长 1d。确保细胞的 $OD_{600}$ 永远不会超过 1。迅速地分离细胞可以减少随时间产生的自荧光。
2. 不要采用 *ADE1* 或 *ADE2* 基因突变的细胞株，否则会导致细胞积聚红色染料。

**问题**：细胞从玻璃面脱离。

**［步骤 14］**

**解决方法**：按照下面列出的几点建议。

1. 铺有刀豆素 A 的 Delta T 培养皿时间太久。尝试使用新铺刀豆素 A 的 Delta T 培养皿。
2. 延长细胞的孵育时间使其有足够时间沉降并附着在培养皿上。

## 实验方案 3：单个 mRNA 转录的成像分析

该实验方案描述了通过稀释重组 GFP 和蓝荧光微球来制作 GFP 校正曲线的方法。随后的实验方案介绍在共转 mRNA 报告基因表达质粒和 MCP-xFP 质粒的固定细胞中的单分子检测方法。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

材料

成像的细胞（共转染的，如实验方案 1 中提到的）
DAPI（4′,6-二脒基-2-苯基吲哚）<!>
甲醛（4%）
封片剂（Prolong Gold，Invitrogen）
磷酸盐缓冲液（PBS）
重组的 GFP 单体（rGFP，纯化的；Clontech）

设备

盖玻片
配有合适部件的荧光显微镜
荧光微球（0.2 μm，蓝色；Invitrogen 或 Duke Scientific，Fremont，Calofornia）
玻片
指甲油
移液器
计算总荧光强度（TFI）的软件包
载物台测微尺（可选择的，参见步骤 7）

### 方法

绘制 GFP 校正曲线

1. 用封片剂（Prolong Gold）制备三个浓度的纯化的 rGFP，从 0.1 mg/ml 到 0.001 mg/ml。
2. 用水把 0.2 μm 大小的蓝荧光微球的浓度从 1∶1000 稀释到 1∶2000。用移液器吸出稀释的微球 5～10 μl 到玻片上，来回移动盖玻片的边缘在玻璃表面上扩展出一薄层的微球溶液。用同样的方法把 5 μl 稀释的微球溶液铺在盖玻片上（这可能会花费更长的时间）。干燥铺有微球溶液的两个表面。每个 rGFP 稀释浓度都要求制备一套这样的表面。
当确定成像的像素大小的时候，黏附在玻璃表面的微球将被用作 *z* 轴标记物。

3. 对于每一个浓度的微球溶液玻片，用移液器吸出 5～10 μl 稀释的 rGFP 到蓝荧光微球干燥的玻片或盖玻片上。在上面放置一本书或扁平物体使成像体积尽可能薄。在这些条件下室温下避光放置过夜使封片剂固化，或按照生产商的指南使用。用指甲油封住盖玻片的边缘，直到它完全干燥方可进行显微镜下的成像实验。
4. 在样本中找到一个视场来成像，通过蓝荧光微球在 $z$ 轴的上下边距来确定两个玻璃表面的距离。这应该与成像的像素相符合。为了准确地确定这一距离，显微镜必须要有一个精确的内置聚焦马达，或者可以配套一压电式定位系统。记录每一个视场的上下位置。
5. 一旦确定了该厚度，在两玻璃表面的中间位置定位样本，从而使样本刚好落在 $z$ 轴体积的中心。调整到 GFP 成像需要的配置，在细胞成像的相应条件下采集视场的一张图像。大部分软件包都可以用来计算视场的 TFI。记录数值。

   在获取相关数据来绘制 GFP 校正曲线前先确定成像细胞的条件。
6. 对于每一个浓度的 rGFP，按照步骤 4 和步骤 5 成像几个随机的视场（3 或 4）。在玻片内每一个视场的 $z$ 轴的深都是不同的；确定被选择的每一个视场的 $z$ 轴厚度和像面中心。
7. 用镜台测微尺或下面的公式来计算像素大小：

$$像素大小(\text{micron}) = \frac{\text{CCD 相机的像素值}}{\text{总放大倍数}} \times 组合因子$$

8. 对于图像的每一个视场：

   i. 用前面步骤中计算得到的尺寸来计算一个满视场成像的 rGFP 溶液的体积：

$$\begin{aligned}体积(\mu m^3) = &[(x\text{ 轴的像素数目} \times 像素大小)]\\ &\times[(该视野\ y\text{ 轴的像素数目} \times 像素大小)]\\ &\times(z\text{ 轴深})\end{aligned}$$

   ii. 计算成像体积中 GFP 分子数：

$$\text{GFP 分子数} = \frac{(N_A)\times[\text{重组 GFP 的密度}(g/\mu m)^3]\times[体积(\mu m^3)]}{\text{重组 GFP 的分子质量}(mol/g)}$$

   式中，$N_A$ 代表阿伏伽德罗常数（$6.022\times10^{23}$ 分子/mol）。
9. 对于每一个浓度的 rGFP，计算步骤 5 得到的 TFI 与步骤 8 得到的成像体积里的 GFP 分子数的比值来得到每个 GFP 分子的平均 TFI。这些点连接绘成的线的斜率代表 TFI/GFP 分子的比值。

## 在固定细胞上检测单分子

10. 共转染的细胞铺板在盖玻片上过夜。用 4% 甲醛固定细胞 10 min。
11. 用 PBS 漂洗细胞 2 次，每次 5 min。用 DAPI 进行核染色。
12. 用 ProLong Gold（或用于 GFP 校正曲线计算中的同样的封片剂）把盖玻片装在显微镜载玻片上。放置一些时间使封片剂固化（室温下避光过夜），样本校正中也需要同样的时间。
13. 用相同与样本校正的光学和成像参数成像细胞（见排疑解难）。
14. 测量每个目标的 TFI。对于在感兴趣区域（region of interest，ROI）中找到的每个

粒子，计算 GFP-MCP 粒子的数目（见排疑解难）。

$$\text{GFP 分子数}=\frac{\text{单个粒子的 TFI}}{\text{每个 GFP 分子的 TFI}}$$

## 排疑解难

**问题**：mRNA 粒子在背景中难以区分。

**[步骤 13 和步骤 14]**

**解决方法**：按照下面列出的几点建议。

1. 参照实验方案 1 中排疑解难部分关于低信噪比的步骤，改变显微镜或相机的配置可以增加信噪比。
2. 采用转换软件程序（如 Huygens，SVI）对细胞的 $z$ 轴系列图像进行加工。以 0.2 μm 递增的步距跨越整个细胞高度来收集 $z$ 系列图像栈。一个内置的 $z$ 轴步进马达可以用来穿过样本并获得多个 $xy$ 面的图像。如果用转换的像面来计算粒子的 TFI，像面的 TFI 除以成像体积中的像面数目就可以得到。
3. 用分析软件定义粒子，总和其来自 $z$ 轴图像的 TFI。背景强度应该不会超过荧光目标物的亮度。因此，粒子应该有更大的信噪比。TFI 的总和除以像面数得到平均 TFI 值。平均 TFI 值除以每一个 GFP 分子的 TFI，从而确定每个粒子上的 GFP 数目。

## 实验方案 4：基于 IMAGEJ 软件的单个 mRNA 粒子追踪

该实验方案描写了 IMAGEJ 软件在分析荧光 mRNA 粒子的动态实时视频帧或图像栈中的应用。出现最大密度投影和波动曲线。

### 材料

设备

ImageJ 软件
活细胞中荧光 mRNA 粒子的动态视频帧或图像

### 方法

最大图像投影

1. 打开含有一套动态视频帧的一个文件，或者输入个别图像作为一个“IMAGE SEQUENCE”。图 10-4（顶部）显示了 Well 等（2007）报道的创建视频 1 的栈图中的第一幅。
2. 点击菜单条中的 IMAGE，点击 STACKS，选择 Z-PROJECTION。
3. 选择 MAXI NTENSITY 作为“投射类型”。一个新的窗口打开显示每个时间点的最亮的像素。经检验，粒子路径应该是明显的，正如图 10-4 所示（中间）。

波动曲线

4. 激活显示动态视频帧的窗口。
5. 在 IMAGE 菜单条目下，点击 STACKS，选择 RESLICE [/]。设定输入和输出间距为“1”，选择图像开始重新剪切的位置（顶端、底部、左边或右边）。将会弹出一个新的窗口，显示在一个图像中被重新切过的像面。
6. 激活“Reslice stack”窗口。在 IMAGE 菜单条目下，点击 STACKS，选择 Z-PROJECTION。这将显示 $x$ 轴位置随 $y$ 轴时间变化的整个视场的波动曲线。
   图 10-4（底部）显示了从图 10-4（中间）的最大强度投射图像衍生出的波动曲线。图 10-4（中间）从顶端开始被重新切片，从而使空间信息可以保留在 $x$ 轴上。$y$ 轴显示了每一动态帧里的粒子位置，其顶端 $t=0$。

### 致谢

感谢 Jason Dictenberg 阅读了手稿，并感谢 Shailesh Shenoy 就成像系统与粒子分析内容方面提出了意见和讨论。我们的工作得到了美国 NIH 的基金资助 AR41480（R. H. S.）和 5P01 CA100324（J. S. C.）。

# 参考文献


Amberg D.C., Burke D., and Strathern J.N. 2005. *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, 2005 edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Bannai H., Fukatsu K., Mizutani A., Natsume T., Iemura S., Ikegami T., Inouie T., and Mikoshiba K. 2004. An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J. Biol. Chem.* **279:** 53427–53434.

Basyuk E., Galli T., Mougel M., Blanchard J.M., Sitbon M., and Bertrand E. 2003. Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev. Cell* **5:** 161–174.

Beach D.L., Salmon E.D., and Bloom K. 1999. Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Curr. Biol.* **9:** 569–578.

Bertrand E., Chartrand P., Schaefer M., Shenoy S.M., Singer R.H., and Long R.M. 1998. Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2:** 437–445.

Bi J., Hu X.L., Loh H.H., and Wei L.N. 2003. Mouse κ-opioid receptor mRNA differential transport in neurons. *Mol. Pharmacol.* **64:** 594–599.

Bi J., Tsai N.-P., Lin Y.-P., Loh H.H., and Wei L.-N. 2006. Axonal mRNA transport and localized translational regulation of κ-opioid receptor in primary neurons of dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 19919–19924.

Campalans A., Kondorosi A., and Crespi M. 2004. *Enod40*, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **16:** 1047–1059.

Chubb J.R., Trcek T., Shenoy S.M., and Singer R.H. 2006. Transcriptional pulsing of a developmental gene [see comment]. *Curr. Biol.* **16:** 1018–1025.

Dictenberg J.B. and Singer R.H. 2007. Dendritic RNA transport: Dynamic spatio-temporal control of neuronal gene expression. In *New encyclopedia of neuroscience* (ed. L.R. Squire). Elsevier, London. (In press.)

Dynes J.L. and Steward O. 2007. Dynamics of bidirectional transport of *Arc* mRNA in neuronal dendrites. *J. Comp. Neurol.* **500:** 433–447.

Femino A.M., Fay F.S., Fogarty K., and Singer R.H. 1998. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* **280:** 585–590.

Femino A.M., Fogarty K., Lifshitz L.M., Carrington W., and Singer R.H. 2003. Visualization of single molecules of mRNA in situ. *Methods Enzymol.* **361:** 245–304.

Forrest K.M. and Gavis E.R. 2003. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for *nanos* mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **13:** 1159.

Fusco D., Bertrand E., and Singer R.H. 2004. Imaging of single mRNAs in the cytoplasm of living cells. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **35:** 135–150.

Fusco D., Accornero N., Lavoie B., Shenoy S.M., Blanchard J.M., Singer R.H., and Bertrand E. 2003. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **13:** 161–167.

Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., and Ellisman M.H. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296:** 503–507.

Gennerich A. and Schild D. 2005. Sizing-up finite fluorescent particles with nanometer-scale precision by convolution and correlation image analysis. *Eur. Biophys. J.* **34:** 181–199.

Golding I. and Cox E.C. 2004. RNA dynamics in live *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 11310–11315.

Golding I., Paulsson J., Zawilski S.M., and Cox E.C. 2005. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell* **123:** 1025–1036.

Hamada S., Ishiyama K., Choi S.B., Wang C.L., Singh S., Kawai N., Franceschi V.R., and Okita T.W. 2003. The transport of prolamine RNAs to prolamine protein bodies in living rice endosperm cells. *Plant Cell* **15:** 2253–2264.

Lim F. and Peabody D.S. 1994. Mutations that increase the affinity of a translational repressor for RNA. *Nucleic Acids Res.* **22:** 3748–3752.

Lim F., Spingola M., and Peabody D.S. 1994. Altering the RNA binding specificity of a translational repressor. *J. Biol. Chem.* **269:** 9006–9010.

Mikhailov A. and Gundersen G. 1995. Centripetal transport of microtubules in motile cells. *Cell Motil. Cytoskelet.* **32:** 173–186.

Park H., Hanson G.T., Duff S.R., and Selvin P.R. 2004. Nanometre localization of single ReAsH molecules. *J. Microsc.* **216:** 199–205.

Peabody D.S. and Ely K.R. 1992. Control of translational repression by protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **20:** 1649–1655.

Rodriguez A.J., Shenoy S.M., Singer R.H., and Condeelis J. 2006. Visualization of mRNA translation in living cells. *J. Cell Biol.* **175:** 67–76.

Rook M.S., Lu M., and Kosik K.S. 2000. CaMKIIα 3′ untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: Visualization by GFP linkage. *J. Neurosci.* **20:** 6385–6393.

Salgo M.G. and Pryor W.A. 1996. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **333:** 482–488.

Salgo M.G., Bermudez E., Squadrito G.L., and Pryor W.A. 1995. Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes [corrected] (erratum *Arch. Biochem. Biophys.* [1995] **324:** 200). *Arch. Biochem. Biophys.* **322:** 500–505.

Shav-Tal Y., Shenoy S.M., and Singer R.H. 2005. Visualization and quantification of single RNA molecules in living cells. In *Live cell imaging: A laboratory manual* (ed. R.D. Goldman and D.L. Spector), pp. 603–615. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S.M., Fusco D., Janicki S.M., Spector D.L., and Singer R.H. 2004. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* **304:** 1797–1800.

Swedlow J., Andrews P., and Platani M. 2005. In vivo imaging of mammalian cells. In *Live cell imaging: A laboratory manual* (ed. R.D. Goldman and D.L. Spector), pp. 329–343. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82:** 2775–2783.

Valegard K., Murray J.B., Stockley P.G., Stonehouse N.J., and Liljas L. 1994. Crystal structure of an RNA bacteriophage coat protein-operator complex. *Nature* **371:** 623–626.

Valegard K., Murray J.B., Stonehouse N.J., van den Worm S., Stockley P.G., and Liljas L. 1997. The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions. *J. Mol. Biol.* **270:** 724–738.

Waterman-Storer C., Sanger J., and Sanger J. 1993. Dynamics of organelles in the mitotic spindles of living cells: Membrane and microtubule interactions. *Cell Motil. Cytoskelet.* **26:** 19–39.

Waterman-Storer C., Duey D.Y., Weber K.L., Keech J., Cheney R.E., Salmon E.D., and Bement W.M. 2000. Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of F-actin transport. *J. Cell Biol.* **150:** 361–376.

Weil T.T., Forrest K.M., and Gavis E.R. 2006. Localization of bicoid mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Dev. Cell* **11:** 251–262.

Wells A.L., Condeelis J.S., Singer R.H., and Zenklusen D. 2007. Imaging real-time gene expression in living systems with single-transcript resolution: Single mRNA particle tracking with ImageJ-based analysis. *CSH Protocols* doi: 10.1101/pdb.prot4872.

Zhang F.L. and Simon A.E. 2003. A novel procedure for the localization of viral RNAs in protoplasts and whole plants. *Plant J.* **35:** 665–673.

## 网络资源

**http://rsb.info.nih.gov/ij/ ImageJ**，图像加工与分析，在 Java 主页上。

**http://cshprotocols.org** 哺乳动物活细胞中 MCP-GFP β-actin 3′UTR mRNA 粒子的时间推移视频。MCP-GFP 与 RSV-LacZ-β-actin 3′UTR（报告 RNA）质粒共转小鼠 C2C12 成肌细胞，采集超过 60 s 的视频，以 15 帧/s 的速率（pdb.prot4872）播放。

**http://www.singerlab.org/protocols** 在线 SingerLab 实验方案。解剖与结构生物学系，Albert Einstein 医学院，Yeshiva 大学。

**http://www.singerlab.org/requests**/可寻求获得试剂。在线 SingerLab，解剖与结构生物学系，Albert Einstein 医学院，Yeshiva 大学。

**http://www.yeastgenome.org/** 酿酒酵母基因组数据库。

（钟伟霞 译）

# 第 11 章　活细胞内随机信号转导事件的单分子成像技术

**Satomi Matsuoka　Yukihiro Miyanaga　Toshio Yanagida　Masahiro Ueda**

Laboratories for Nanobiology, Graduate School of Frontier Biosciences,
Osaka University, Suita, Osaka,, 565-0871, Japan

## 摘要

环境变化会在细胞膜引发信号转导事件。为了开发在分子层面理解这些事件的手段，熟悉活细胞中信号转导分子的随机性这一特性是很必要的。使用全内反荧光显微镜（total internal reflection fluorescent microscopy，TIRFM），就可以在单分子层面直接观察这些信号转导事件。这一章描述了使用 TIRFM 使活细胞膜上的单分子成像的方法，详细说明了实施恰当的分析实验所必需的操控方法。

## 概述

活细胞可以通过胞内信号转导过程，灵活且高适应地对环境的变化做出回应。大量的实验成功地定义了各种生物分子及它们在信号转导过程中的角色。胞内信号转导过程包括结合/分离、酶级联反应、化学修饰、构象改变及信号分子的扩散。这些过程以随机的方式发生；因此，沿着信号级联通路发生的信号处理与转导本来就是有干扰的。现在还不是十分清楚，活细胞内随机的信号转导系统如何在强烈的干扰影响下可靠地运行，以接收、处理、转导信号。为了开发随机生物分子运算的机制，理解活细胞内信号转导分子随机的特性就十分重要了。对环境产生回应后在膜上产生的信号转导事件可以用全内反荧光显微镜（TIRFM）在单分子层面直接观察到，这为阐明活细胞内生物分子的随机性提供了独特的工具（Miyanaga et al. 2007）。

这一章包括了使在活细胞表面行使功能的单分子成像的方法。我们首先描述 TIRFM 的仪器配置，然后描述物镜型的 TIRFM 下的单分子成像方法及一些实验，提供一些实验来证明被成像的荧光的确反映了作为研究对象的靶分子的活动。此外，我们给出了一种能同时分析数个关键参数的方法，关键参数包括从膜上解离的速率常数及膜上的扩散系数。

## 仪器配置

### 活细胞全内反荧光显微镜

水溶液中单个染料分子发出的荧光信号现在已可以通过使用隐失场（evanescent field）减弱背景干扰的技术而检测到（Funatsu et al. 1995；Tokunaga et al. 1997；Wazawa and Ueda 2005）。隐失场可以由入射光在玻璃盖玻片及水介质（或细胞）间的平坦界面上产生全反射而形成（图 11-1A）（Axelrod 2001）。虽然所有的光在玻璃上被

反射回去，但因为电磁场的连续的特性，光所包含的能量穿透两者间的界面并进入水介质（或细胞）。这种穿透后的光被称为隐失场，它与入射光的波长相同，但没有扩散波的属性。

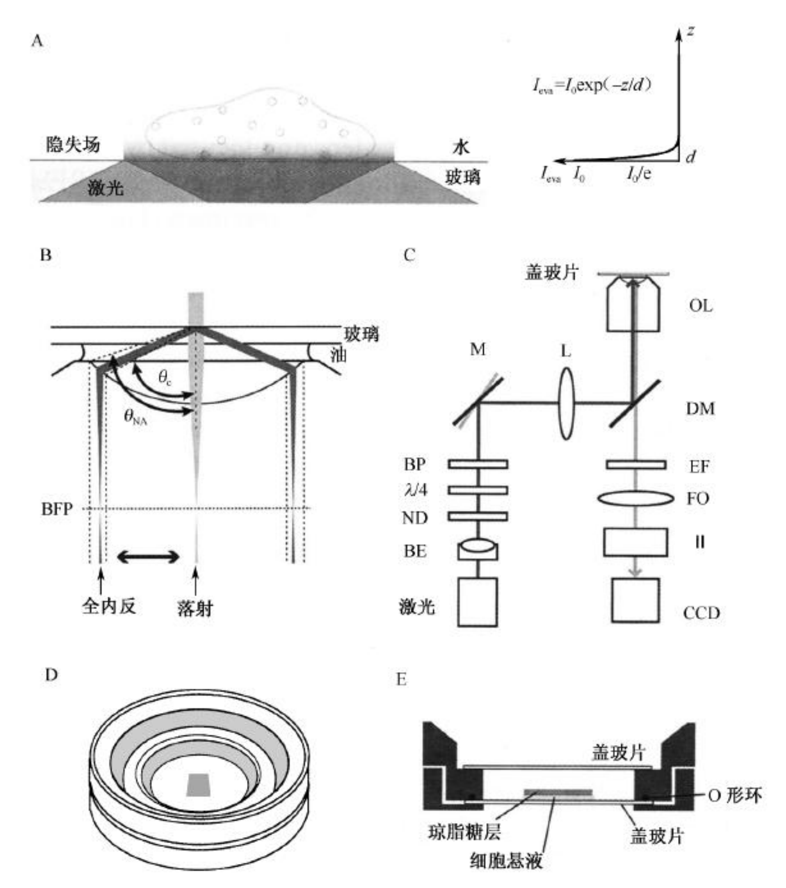



图 11-1　物镜型 TIRFM。A．活细胞内单分子成像的原理图（见正文）。B．激发光的原理图（见正文）。C．物镜型 TIRFM 的配置。BE（beam expander，光束扩展器）；ND（neutral density filter，中灰密度滤光片）；λ/4（quarter wave plate，1/4 玻片）；BP（bandpass filter，带通滤光片）；M（mirror，反光镜）；L（focusing lens，聚焦透镜）；DM（dichroic mirror，分色镜）；OL（objective lens，物镜）；FO（focusing optics，聚焦光学器件）；II（image intensifier，图像增强器）；CCD（charge-coupled device，电荷耦合器件）。改变置于聚焦透镜聚焦点的反光镜的角度，可以改变激光束进入玻璃-水界面的入射角。D、E. 成像室的原理图。带一层琼脂糖（agarose sheet）、可使黏菌（dictyostelium）生长的盖玻片（coverslip），上面盖另一个盖玻片的盖玻片室可于市场上买到。D．概览。E．横截面。

隐失场的强度从界面起沿标准距离成指数级衰减（图 11-1A），即 $I_{eva}=I_0\exp(-z/d)$，式中，$I_0$ 为玻璃-水界面处的强度；$z$ 为距界面的距离；$d$ 为当强度变为 $I_0/e$ 时的穿透

深度。穿透深度 $d$ 由波长 $\lambda$ 确定，玻璃的折射率为 $n_1$，水的折射率为 $n_2$，入射角为 $\theta$，它们间的关系是 $d=\lambda/(4\pi)(n_1^2-\sin^2\theta-n_2^2)^{-1/2}$ 。玻璃与水的折射率 $n_1$ 及 $n_2$ 分别为 1.52 及 1.33。当使用波长为 488 nm 和 532 nm 的激光作为激发光，以 64°的入射角射入时，$d$ 分别变为 124 nm 和 136 nm。这样，激发光就被限制在距玻片表面的这一段距离内。于是由背景水介质（或细胞）内的荧光染料激发产生的干扰被减少了。

仅当染料分子附着到盖玻片、细胞膜、细胞骨架等骨架结构上，三维扩散运动被限制时，被隐失场激发的荧光分子才能成为可见的荧光光点。在 TIRFM 下观察含有荧光染料的缓冲液时，可以观察到非特异性吸附在玻璃表面的不移动荧光光点，以及由自由扩散进入隐失场的分子形成的特定强度的背景荧光。此原则在成像活细胞中的单分子时也同样适用。在黏附于玻片的细胞内，荧光分子仅能在可及细胞基膜的隐失场内被激发（图 11-1A）。仅那些与基膜结合而非自由游离于胞浆内的荧光分子才能在 TIRFM 下被检测到。

为了向内将激发光反射到玻璃-水界面，可以使用两种 TIRFM 来进行单分子成像——棱镜型（prism type）及物镜型（objective type）（Funatsu et al. 1995；Tokunaga et al. 1997；Wazawa and Ueda 2005）。其中，物镜型的 TIRFM 常被用于活细胞成像（Sako et al. 2000；Iino et al. 2001；Ueda et al. 2001）。入射角大于临界值的激发光是把光路放到物镜周边得到的（图 11-1B）。发出的荧光同样由这个物镜收集。这种配置可以观测相对较厚的标本，如活细胞。因为可以随意地接触标本，所以物镜型的 TIRFM 可以与电记录或电扫描探头显微镜一起组合使用（Ide and Yanagida 1999；Kitamura et al. 1999）。

## 配置物镜型 TIRFM

图 11-1C 是基于倒置显微镜（如 IX70，Olympus，Japan）组建的物镜型 TIRFM。激光束分别穿过光束扩展器（如 LBED，Sigma Koki，Japan）、中灰密度滤光片（Sigma Koki，Japan）、1/4 玻片（如 WPQ5900-4M，Sigma Koki，Japan）后被扩展、减弱、去极化。聚焦透镜把激光束聚焦在倒置显微镜的物镜的后聚焦面。当激光束通过物镜的中轴时，显微镜作为标准的落射荧光显微镜（epifluorescence microscope）起作用（图 11-1B）。把入射光光路移动到物镜的周边即可以达到全内反的效果。必须恰当地调整反光镜的位置和角度才能移动入射光光路（图 11-1C）。从荧光团发出的荧光信号可以由物镜接收并由聚焦光学器件聚焦。

物镜型 TIRFM 使用的物镜必须有一个比标本的折射率更大的数值孔径（numerical aperture，NA）（图 11-1B）（Tokunaga et al. 1997；Axelrod 2001；Wazawa and Ueda 2005）。根据标本的折射率（$n_2$），临界角（$\theta_c$）可以由 $n_1\sin\theta_c=n_2$ 计算而得，式中 $n_1$ 为玻璃的折射率（$n_1=1.52$）。激光的入射角是由物镜的数值孔径（NA）限制的，能达到的最大角度 $\theta_{NA}$ 由以下公式决定：$n_1\sin\theta_{NA}=NA$，其中 $n_1$ 为油的折射率（$n_1=1.52$）。因为大于 $\theta_c$ 的入射角对全内反来说是必要的，所以 $\theta_{NA}$ 必须要大于 $\theta_c$，即必须有 $NA>n_2$。为了在活细胞内观察（$n_2=1.37$，$\theta_c=64.3$），可以使用 NA 为 1.4 或 1.45 的物镜。NA 为 1.45 的镜头（$\theta_{NA}=72.5$），为设定入射角提供了更大的调整空间，它比 NA 为 1.4 的镜头更有用（$\theta_{NA}=67.1$）。

分色镜和滤光片对单分子图像的信噪比也有显著的影响。所选的分色镜和滤光片必须能排除入射激光的散射光，减少荧光信号的损失及增大信号波长的特异性。例如，当观察黏菌活细胞时，我们对每个已知荧光团使用了以下的激光、激发光滤光片（excitation filter）、分色镜及发射光滤光片（emission filter）。Cy3 标记的分子：Ar/Kr 激光（568 nm，风冷激光 643-RYB，Melles Griot）、HQ565/30M（Chroma）、DM580（Olympus）及 HQ620/60M（Chroma）；绿荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）融合蛋白：Ar/Kr 激光（488 nm，643-RYB，Melles Griot）、BP470-490（Olympus）、DM500（Olympus）及 BA510-550（Olympus）；四甲基罗丹明（tetramethylrhodamine，TMR）标记的分子：二极管泵浦（diode-pumped）激光（532 nm，Compass 315M，Coherent）、FF555-Ex02（Semrock）、FF555-Di01（Semrock）及 FF555-Em02（Semrock）。

图像可以通过图像增强器被增强（如 GaAsP C8600-05 Hamamatsu Photonics，Japan）、然后由电荷耦合器件（charge-coupled device，CCD）相机获取（如 EB-CCD，C7190-23，Hamamatsu Photonics，Japan）。

## 细胞膜表面信号转导事件的成像

### 用荧光标记构建功能性的信号分子

构建带荧光标记的分子时必须十分谨慎。为了用单分子成像时获取的动力学参数讨论细胞信号的特性，待观测分子的行为必须与膜上的荧光点有相关性。而且极关键的一点是，荧光团不能干扰待观测分子的功能。验证这一点的最简单的方法是，采用带荧光标记的分子替代原先的分子。强烈建议做下述实验。

当标记如趋化因子或生长因子等胞外配体时，必须确认标记后的配体能否以未标记的配体一样的方式激活信号转导通路（Sako et al. 2000；Ueda et al. 2001）。这些带荧光的类似物激活通路后，需检查各种细胞特性是否改变，如趋化性、细胞增殖能力及第二信使的激活。也应检查配体与膜上受体的特异性结合能力是否改变，如是否与未标记的配体一起竞争性结合。我们先前构建了的 cAMP（cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate）的荧光类似物，是一种阿米巴型的黏菌（*Dictyostelium discoideum*）的趋化因子（Ueda et al. 2001；Janetopoulos et al. 2004）。黏菌细胞沿着 cAMP 的浓度梯度显示出趋化性，这个梯度是通过从微量移液管的尖端释出 cAMP 形成的。cAMP 的带荧光标记类似物 Cy3-cAMP 同样吸引了黏菌细胞。Cy3-cAMP 存在时落射荧光显微镜下观察细胞可见，Cy3-cAMP 的荧光均一地分布在膜上，这显示 cAMP 受体有着同样的分布模式（Xiao et al. 1997）。此外，Cy3-cAMP 在膜上的积聚现象可以因加入未标记的 cAMP 而减轻。这些结果指示，可以使用这种带荧光标记的类似物。

常用的胞内的功能性蛋白成像方法是，用荧光蛋白（GFP 或其他变体）或标记蛋白（如 Halo 标记蛋白）（Iino et al. 2001；Hibino et al. 2003；Matsuoka et al. 2006）表达融合蛋白。必须通过把融合蛋白转入一个缺少靶蛋白的基因敲除（knockout）菌株以确认融合蛋白的功能。这些步骤可以容易地在黏菌（*D. discoideum*）内完成（Howard et al. 1988；Manstein et al. 1989）。使用这种单倍体生物已经成功构建了功能性的

趋化信号分子融合蛋白，包括 cAMP 受体、G 蛋白三聚体的亚单位、三磷酸肌醇激酶（phosphoinositol-3 kinase，PI3K）及 PTEN。以 PTEN 为例，PTEN 是一种 PI（3,4,5）P3 磷酸酶，与细胞极性的确立有关，因此 PTEN 敲除细胞的分化及趋化移动有显著缺陷（Iijima and Devreotes 2002；Janetopoulos et al. 2005）。当在 *pten*-null（无 PTEN）菌株内转入能表达 Halo 标记蛋白（PTEN-Halo）的质粒后，细胞表型与野生型更接近，这指示 PTEN-Halo 在黏菌细胞中可以替代内源的 PTEN（图 11-2）。PTEN-Halo 可均一地在膜上检出，可用 TMR 交联的 Halo 标记配体染膜后显示出来。这样，我们可以得出结论，融合蛋白可在活细胞单分子成像中使用。

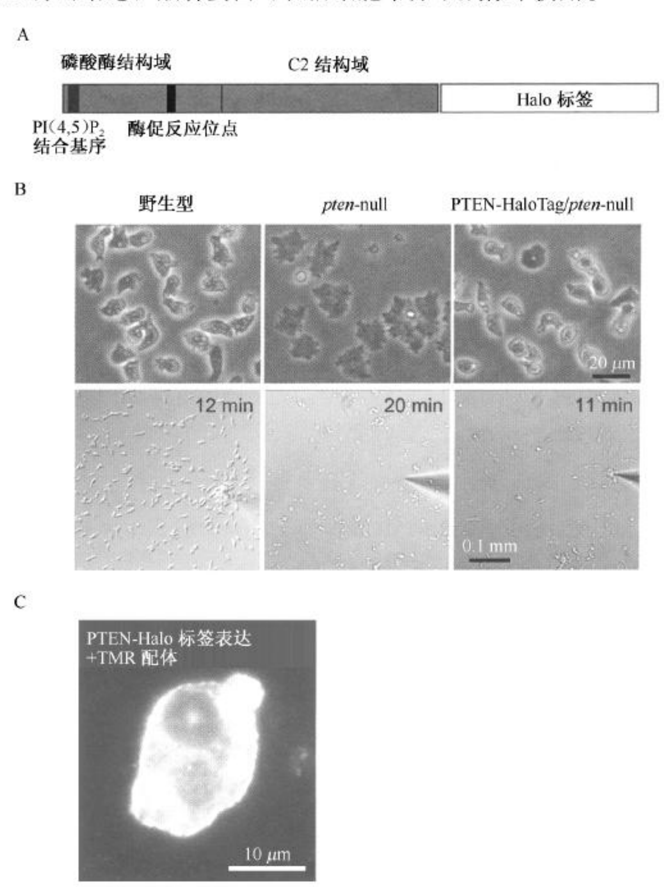



图 11-2 用荧光染料标记后，分子行使原先功能的证明。黏菌细胞内 PTEN 与 Halo 标记蛋白的融合蛋白（PTEN-Halo）替代了内源的 PTEN。融合蛋白的氨基酸结构（A）。野生型、*pten*-null、*pten*-null 表达 PTEN-Halo 三者的细胞形态（B）和趋化性应答（C）。*pten* 基因被敲除后，异常形态（指示细胞动力学缺陷，B）和趋化性缺失（C）都因表达 PTEN-Halo 而被补足。

**设置成像室**

盖玻片上的灰尘等人为假象会干扰对感兴趣分子的正确探知（Funatsu et al. 1995）。因为 TIRFM 可以感知十分微弱的信号（如从单独的染料分子上发射出的荧光），所以它也可以感知人工假象处的非特异信号。盖玻片不能沾灰尘，在溶液里也不能让溶液中的染料非特异性地吸附到表面上；处理盖玻片的方法见实验方案 2。

感兴趣的区域，如基膜，必须被放置在被激发光穿透的地方。黏菌细胞及培养的哺乳动物细胞，如 HeLa 或 HEK293 细胞，会黏附到清洗过的盖玻片上（Ueda et al. 2001；Matsuoka et al. 2006；Vazquez et al. 2006）。有时候，膜的一部分在可激发区域之外，这使得单分子成像变得困难。为了保持基膜位于可激发区域内，琼脂覆盖法对于黏菌细胞就十分有用（实验方案 2）（Ueda et al. 2001；Matsuoka et al. 2006）。这种方法针对的是细胞骨架结构的高质量成像（Fukui et al. 1987）。

在接下去的实验方案中，我们描述了为了在活黏菌细胞中的单分子成像，对细胞所做的准备、处理和对成像室的准备。实验方案 3 描述了 TIRFM 下成像的过程。

## 实验方案 1：趋化感受态黏菌细胞的制备

我们在这里描述趋化感受态细胞的制备。黏菌细胞对趋化因子的刺激有高感受性，使细胞接近趋化因子的实验方案在先前已经很好地描述过了（Devreotes et al. 1987）。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

试剂

咖啡因

cAMP（1 μmol/L）

development buffer（DB）[成像液（imaging medium）]

- 5 mmol/L $Na_2HPO_4$
- 5 mmol/L $NaH_2PO_4$
- 2 mmol/L $MgSO_4$< !>
- 0.2 mmol/L $CaCl_2$< !>

将各试剂溶于水后调整 pH 至 6.2。定容后过滤溶液灭菌（孔径0.23 μm）。

黏菌细胞

HL5 培养液

- 30.8 g 葡萄糖
- 14.3 g 酵母提取物
- 28.6 g 间质蛋白胨（proteose peptone）No.2（Difco）
- 0.97 g $KH_2PO_4$
- 2.56 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$
- 0.4 mg 叶酸
- 0.12 mg 氰钴维生素（cyanocobalamin）

将各试剂溶于 2 L $H_2O$ 后高压灭菌。

设备

滤器（孔径 0.23 μm）

恒温孵育器（21℃）

所有细胞培养及孵育都需在 21℃下完成。

Petri 培养皿（Petri dish）（35 mm）

振荡器

### 方法

1. 以标准方法（Watts and Ashworth 1970）在 HL5 培养液内培养黏菌细胞。

2. 收集培养的细胞。用 development buffer（DB）洗细胞后再用 DB 重悬细胞，使细胞密度至 $3\times10^6$ 个/ml。
3. 倒 1 ml 细胞悬液于 35 mm Petri 培养皿。
4. 在孵育的第一小时内保持培养皿静置，然后将培养皿放至振荡器，在接下去的几小时内每 6 min 加入 10 nmol/L（终浓度）的 cAMP，直至细胞显示极性的形态，这种形态是黏菌细胞到达趋化感受态的标志。

   总孵育时间因细胞株的不同而不同，但对于我们实验室使用的野生型来说一般是 4 h。
5. 加入咖啡因至终浓度为 2 mmol/L。

   咖啡因作为腺苷酸环化酶抑制剂起作用，这样可以得到无 cAMP 培养的细胞（Parent et al. 1998）。
6. 至少孵育细胞 15 min。

# 实验方案 2：细胞的处理及成像室的准备

用所需的化合物处理趋化感受态细胞后，把细胞悬液移到盖玻片上，用一片很薄的琼脂糖片覆盖在上面，准备成像。一般使用带荧光标记的刺激剂或抑制剂处理细胞。也可以使用光反应化合物，利用它们笼式的复合物刺激细胞。一个笼式复合物可以在紫外光的照射下产生光反应，这种照射可以打断笼式结构和化合物结构间的连接。这样，在记录单分子成像的一段期望的时间内，化合物浓度可以因溶液中笼式复合物的光分解而增高。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

琼脂糖 M（2%；Amersham Pharmacia Biotech AB）

处理细胞用的化合物（如 Cy3 标记的 cAMP、笼式的 cAMP、latrunculin A 或其他抑制剂）

development buffer（DB）[成像液（imaging medium）]

- 5 mmol/L $Na_2HPO_4$
- 5 mmol/L $NaH_2PO_4$
- 2 mmol/L $MgSO_4$＜!＞
- 0.2 mmol/L $CaCl_2$＜!＞

将各试剂溶于水后调整 pH 至 6.2。定容后过滤溶液灭菌（孔径 0.23 μm）。

当溶解琼脂糖 M 时，不要加入 $MgSO_4$ 和 $CaCl_2$。

黏菌细胞（准备方式如实验方案 1 所述）

乙醇

KOH（0.1 mol/L）＜!＞

$Na_2HPO_4$（5 mmol/L）

$NaH_2PO_4$（5 mmol/L）

### 仪器

Attofluor 细胞室（Invitrogen）

高压灭菌锅（或微波炉）

盖玻片（直径 25 mm）

盖玻片在 0.1 mol/L KOH 内超声 15 min，然后先用超净水洗，再用纯乙醇洗。盖玻片对荧光染料分子的非特异吸附在洗涤后会降到很低的程度，而且不影响单分子成像。

滤器（孔径 0.23 μm）

滤纸

湿箱（21℃）

载玻片（玻璃材质）

## 方法

1. 准备琼脂糖薄片的方法是，把琼脂糖放入成像液，高压灭菌或用微波炉加热使之溶解，然后在两载玻片间夹一片 0.17 mm 的盖玻片，在这两片载玻片中使琼脂糖固化。
2. 用成像液离心洗涤黏菌细胞 2 次。

   培养液或成像液可导致背景荧光增强。培养液通常含有发出自身荧光的物质，成像液含有饥饿期细胞胞吐出来后自由溶解于溶液的 GFP 分子。
3. 用成像液重悬细胞至所需的细胞密度，最高至 $1\times10^7$ 个/ml。
4. 在这一步加入恰当浓度的所需药物，如 Cy3 标记的 cAMP、笼式 cAMP、latrunculin A 或其他各种抑制剂。

   我们使用 10 μmol/L 笼式 cAMP（Dojindo，Japan），随时间增加胞外 cAMP 浓度，刺激黏菌细胞。
5. 放置 10 μl 悬液至洗涤后并置于湿箱内的盖玻片。等待数分钟使细胞固着于玻璃表面。
6. 仔细地将 0.17 mm 厚的琼脂糖薄片盖到细胞上去。当琼脂覆盖就位后，用滤纸吸掉多余的液体。在湿箱中孵育数分钟，使细胞适应琼脂覆盖的状态。

   可以通过吸掉不同的多余水分量来控制覆盖层的状况。
7. 把盖玻片置于 Attofluor 细胞室（Invitrogen），在细胞室上部的凹处另外放置一片玻璃盖玻片，使标本不易变干。

## 实验方案 3：在 TIRFM 下成像活细胞的单分子

接下去的实验方案描述了物镜型 TIRFM 下黏菌活细胞内单荧光分子的成像过程。这种方法可以应用到其他种类的细胞上去。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

黏菌细胞

如实验方案 1 及实验方案 2 所述方式准备、处理细胞。

#### 设备

CCD 相机（如 Hamamatsu Photonics，C7190-23、C9100 或 Texas Instruments，MC681SPD）

落射荧光显微镜

图像增强器（如 Hamamatsu Photonics，C8600-05）

激光< !>

TIRFM（准备方法见本章一开始的仪器配置部分）

#### 方法

1. 设置好 TIRFM，打开激光、图像增强器、CCD 相机。如果要用电脑终端机获取图像的话就打开电脑。

   我们这里假设研究者熟悉标准落射荧光显微镜的基本操作。

2. 把成像室放置在载物台上，在透射光照射下给标本对好焦。
3. 关掉透射光，打开光闸（shutter）使激光照至标本。调整镜面，用 $\theta=0$ 的入射角在落射荧光照射下观察标本。
4. 调整镜面角度，使激光束在玻璃盖玻片和水间的界面全内反射。

   i. 先用眼睛观察图像（指不用相机），用最强强度的激光。

   这样的情况下，在荧光点还不可见时即可以杜绝不恰当的激发。

   ii. 确定黏附在玻璃表面的染料发出的荧光点看上去有相同的大小和强度。

5. 把光路调至摄像光路。调整激光强度、图像增强器的灵敏度和（或）相机至适合显微摄像。

   i. 每一次在引导入射光至摄像光路前，要十分小心，注意不要使图像增强组件暴露于强光下。

   ii. 把激光强度减弱后再改变光路。然后在屏幕上观察图像时逐渐增加灵敏度。

   灵敏度决定了信号需被放大的程度。灵敏度越高，从荧光点及背景来的信号和干扰就越高。此外，散粒干扰（shot-noise）也越常发生。

iii. 逐渐增加激光强度。

在我们的实验中，488 nm 的 3 mW 激光或 532 nm 的 2 mW 激光足以激活 GFP 或 TMR，并发出可以被识别为一个点的荧光。此功率可以在入射角 $\theta=0$ 时在载物台上测得。而且，对入射角的调节越精确就可以得到越强的隐失场。这是因为，隐失场在 $z=0$ 的强度 $I_0$ 也是由激光的入射角决定的。

6. 找到目标细胞并把它移至视野内。
7. 开始获取图像。对于笼式化合物的光分解，我们使用针孔，定位高电压汞灯的光束至目标细胞旁边的一小块区域（见排疑解难部分）。

## 排疑解难

**问题**：荧光不能成像为一个点。

**[步骤 7]**

**解决方法 1**：引起问题的原因最可能源于光学部件或细胞内。首先，单独成像荧光染料以检查光学部件。在这种情况下，TMR 比 GFP 更好，因为它发出更强的荧光。用含有荧光染料浓度大约为 10 nmol/L 的溶液充满成像室，检查光学部件，直至可探知荧光光点。如果问题出在光学部件，很可能出自入射角的设置，入射光到达载物台的能量，或在图像增强过程中不恰当的灵敏度设置。在排除了光学部件的问题后，标记 TMR 或 Cy 的分子即使在细胞膜上都应被检出。但是在观察细胞内的 GFP 融合蛋白时，有时需要进一步的调整，特别是入射角及激光能量，因为 GFP 的荧光强度低于 TMR 或 Cy 染料。

**解决方法 2**：问题可能由表达的融合蛋白引起。可能的问题是荧光蛋白表达失败，与荧光蛋白融合后掩盖了膜定位的基序，或这个蛋白质的本来特性就是不表现与膜的亲和力。这时必须在落射荧光显微镜下观察细胞是否恰当表达了荧光蛋白。

**问题**：膜上的荧光过多。

**[步骤 7]**

**解决方法**：当观察用 GFP 或它的类似物标记的蛋白质时，至少有三种方法减少膜上的荧光分子数量。最方便的方法是适当量的光漂白。注意长时间用高光强度进行光漂白时细胞会受损。这时最好使用其他一些方式检查细胞的状态。另一个方法是使用融合蛋白表达水平很低的细胞。同样有效的是把表达载体换成启动子表达水平低的载体。我们把黏菌细胞某表达载体里的一个增强子截除后成功降低了表达水平（T. Dean，未发表）。最后一个方法，也被证明是我们试验过的最有效的方法，就是用 Halo 标记（Promega）构建融合蛋白。TMR 等荧光染料可以通过融合于靶蛋白的 Halo 标记蛋白介导标记靶蛋白。Halo 标记蛋白共价地结合于耦合了荧光团的特异配体。耦合了荧光团的 Halo 标记配体可以通过细胞膜。这样，我们可以不依赖融合蛋白表达水平，改变 Halo 标记配体的浓度及孵育时间来控制标记效率。在我们实验室，把细胞浸泡在含 0.02～0.5 μmol/L TMR 耦合的 Halo 标记配体溶液里 1～5 min，就可以在活细胞内成功成像单个蛋白质。如果打算成像胞外标记了荧光染料的配体，必须降低荧光类似物的浓度。

## 证明检测到的荧光是染料单分子发出的

在分析数据之前，必须证明检测到的点状荧光是发自单分子染料分子（图 11-3A）。为了证明这点，需检查单分子的数个典型特征。检查特征之一是进行单步光漂白（Funatsu et al. 1995；Sako et al. 2000）。在连续的激发下，荧光团应该按照泊松统计分布（Poisson statistics）被漂白。吸附在玻璃表面的单分子染料荧光强度应该显示出“单步”的下降（图 11-3B）。光漂白前后的平均荧光强度差即代表这个荧光团的荧光强度。分子与分子间测量所得的荧光强度稍有不同，强度应该按照单个平均值正态分布，这是单分子的第二个特征（图 11-3C）。此外，单分子发出的荧光常显示一亮一暗的闪烁，这被称为“眨眼”（Dickson et al. 1997）。最后，染料单分子放出的荧光光点直径必须为 0.5 μm 左右。这样的大小是由 Airy 斑（艾里斑，Airy disk）决定的，Airy 斑是点状光源被镜头收集后形成的一种二维衍射图案。因为荧光分子的大小比波长小，所以它被认为是点状光源。电子显微镜下已证明这种大小的光点实际上发自单分子（Funatsu et al. 1995）。

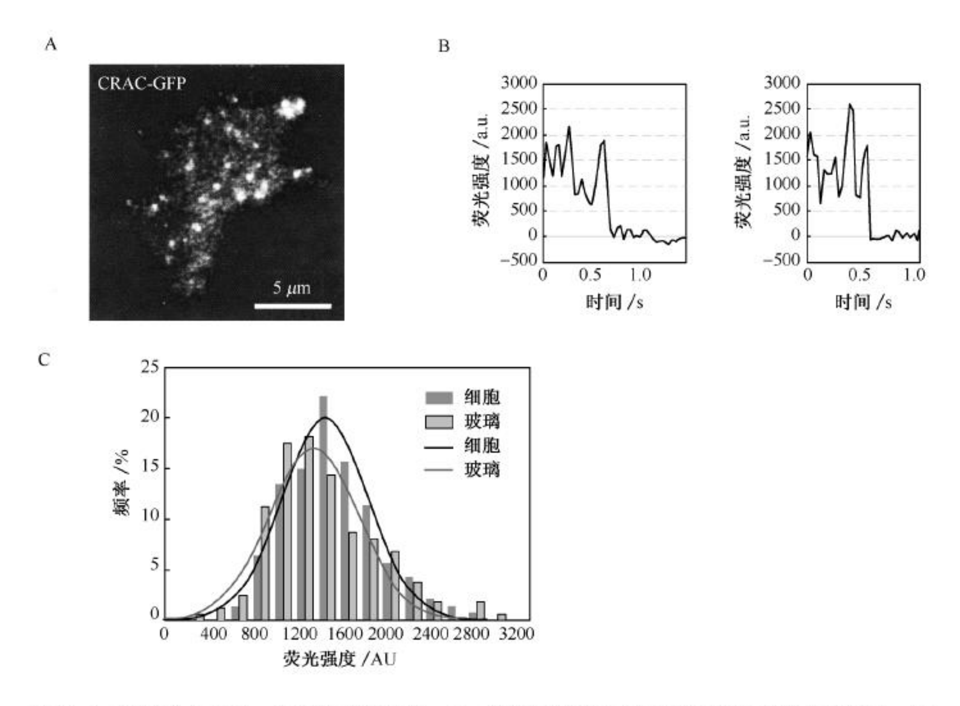



图 11-3 荧光光点表示一个单分子的证明。A. 活黏菌细胞上与膜结合的典型单分子图像。白色光点表示 CRAC-GFP 的单分子，这种分子与黏菌的趋化性信号转导有关。B. 活细胞（左）及固定细胞（右）中荧光分子的量子化光漂白例子。C. 在活细胞内（深灰色条）及盖玻片表面（浅灰色条）观察到的 CRAC-GFP 光点荧光强度频数分布图。（Matsuoka et al. 2006，允许后重印 [© Company of Biologists]）

在细胞膜上的单分子也应该表现出这些典型特征。严格来说，荧光光点的消失不能简单地被认为是光漂白。分子可能在光漂白发生前就与膜解离。但是，如果膜上的单分子已被成功成像，荧光光点的大小约为 0.5 μm，且在它亮的时候测得的荧光强度会和吸附到玻璃表面的单分子有一样的分布模式（图 11-3C）。这是证明膜上检测到的荧光光点表示单分子的证据。为了检验光漂白的真实性，需使用固定后的细胞，它结合在膜上的分子不再从膜解离（图 11-3B）。可以使用甲醛等固定剂。不然的话，需使用表达 GFP（或 Halo）标记的膜内在蛋白，如膜上的受体等，需在观测条件下测定它们荧光团的光漂白率。

这些步骤非常重要，因为在接近基膜时其他细胞质内结构常会被成像，成为干扰。这种人工假象有时源于细胞质内的粒状结构，它们发射出的自发荧光波长在激发光滤光片的通透范围内。为了避免这些问题，需观察未用荧光分子标记的细胞作为阴性对照，这种对照是不可或缺的。

## 数据分析

膜上单分子的轨迹为信号转导过程的动力学提供了有趣的信息。这里，我们主要分析从观察到的轨迹推测得的解离率和扩散系数。我们也讨论使用单分子检测技术来决定这些动力学常数的优势。

### 解离常数

膜上一个分子与其结合物解离的动力学可以通过用统计学分析这个分子与膜结合的寿命周期得到。这种方法和单通道门控分析使用的方法相似（Sakmann and Neher 1995）。在简单的分子间相互作用中，这种反应可以被写成

$$\mathrm{R}+\mathrm{L}\underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}}\mathrm{RL}$$

式中，R、L、RL、$k_+$ 和 $k_-$ 分别为受体（或蛋白质）、配体（或结合物）、复合物、结合率和解离率的常数。如果解离由泊松过程控制，保持在 RL 复合物中的可能性会随时间按指数函数 $\exp(-k_- t)$ 下降。通过单分子成像，我们可以测量单分子的寿命周期，得到这个概率函数（图 11-4A）。假设所有的分子在 $t=0$ 时都开始与膜结合，就可以与膜结合状态分子比例对时间作图，这个图像由与受体结合的配体的解离曲线构成（图 11-4B）。可以把解离曲线的斜率代入以下函数而确定解离率：

$$f(t) = a_1\exp(-k_1 t) + a_2\exp(-k_2 t) + \cdots + a_i\exp(-k_i t)$$

式中，$a_i$ 表示第 $i$ 个成分的相对量，即 $a_i$ 的和等于 1

$$\sum_{i=1}^{N} a_i = 1$$

多个解离率指示的是膜上受体的多个状态或结合物的多种类型。在这个过程中，可以排除测量所得的寿命周期反映了荧光团光漂白率的可能性。光漂白率常数是由吸附到玻璃表面的分子或膜整合蛋白的荧光光点寿命周期所决定的（图 11-4B）。

在确定解离的动力学的特征时使用单分子检测技术可以提供一个机会，在单细胞里考

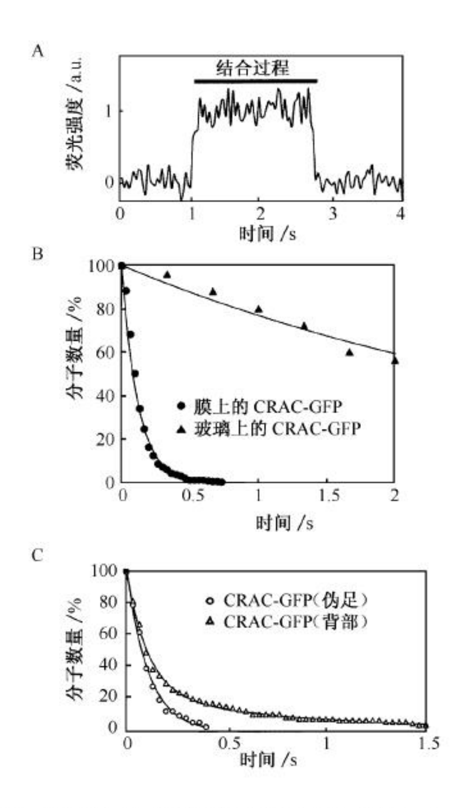



图 11-4 结合于膜上的 CRAC-GFP 的解离率单分子分析。A. 活黏菌细胞上出现、消失的荧光光点强度的典型时间曲线图。B. 从膜上解离的 CRAC-GFP 及玻璃上 CRAC-GFP 激发后光漂白的解离曲线。膜上 CRAC-GFP 分子的寿命周期是在开始20 s后全细胞用 cAMP 激活后测量的（Matsuoka et al. 2006）。解离常数为 8.33 $s^{-1}$，这个值充分大于光漂白率（0.26 $s^{-1}$）。C. CRAC-GFP 从伪足（圆圈）或背部（三角）膜解离的解离曲线。伪足解离常数为 9.09 $s^{-1}$，背部解离常数为 9.09 $s^{-1}$和 1.12 $s^{-1}$（Matsuoka et al. 2006，允许后重印［© Company of Biologists］）。

察由细胞极性和形态学结构决定的解离率的差别（Hibino et al. 2003；Matsuoka et al. 2006）。在趋化性上，信号转导途径沿着分布在细胞极性两端的趋化因子浓度梯度被激活。在面向较高 cAMP 浓度并会随之形成伪足的那一侧，通过膜上的 plekstrin homology（PH）结构域和 PI（3,4,5）P3 间的相互作用，某些特定的信号转导蛋白集聚到膜上。使用单分子检测技术可以在趋化性迁移的黏菌细胞中观察，富含 PI（3,4,5）P3 的伪足内的 PI（3,4,5）P3 结合蛋白 CRAC 和其他区域间的解离动力学（Matsuoka et al. 2006）。在伪足中，膜上的 CRAC-GFP 以常数解离，这个常数与测得的 GFP 融合 PH 结构域（PH-GFP）的解离常数相同。此外，在背部膜上的 CRAC-GFP 分子有两个解离常数。这里的解离速度比伪足上的慢，指示在背部区域有与 CRAC 效应器的相互作用。

对于挂在膜上的蛋白质来说，需在认定这个蛋白质是向膜还是向胞浆移动前加以注

意。例如，异三聚体 G 蛋白的 α 和 γ 亚单位是翻译后修饰以脂肪酸而被锚定在膜上的，传统观点认为，不论在 G 蛋白偶联受体（G-protein-coupled receptor，GPCR）被激活前还是激活后，两个亚单位都没有从膜上解离。仍有争议的是，在信号转导过程中这些挂在膜上的蛋白质在胞内的分布是否被主动调控。单分子成像就可以为与膜的结合和解离提供直接的证据。但需要指出，TIRFM 下单分子成像时每一个荧光都会因光漂白而在一段时间后消失，这使得认为这个分子从膜上“解离”的结论很令人疑惑。为了澄清这个疑点，需要用一些膜整合蛋白测定荧光寿命周期，蛋白质需和挂在膜上的蛋白质使用相同的荧光团标记且表达在相同的背景中。

## 膜上的扩散系数

因为分子在膜上平行扩散，可以通过跟踪标记在分子上的荧光染料在膜上的轨迹以确定转录的扩散系数。当获取单分子的轨迹时，把荧光强度分布在两个维度中都代入到正态函数后，可以用动态影像的每一帧里面的 $x$ 和 $y$ 坐标确定荧光光点的位置（图 11-5B）。每一个时间间隔的均方位移（mean square displacement，MSD）都按时间画了出来（图 11-5C）。在单纯的布朗运动扩散中，各个点的回归线与函数 $MSD = 4Dt$

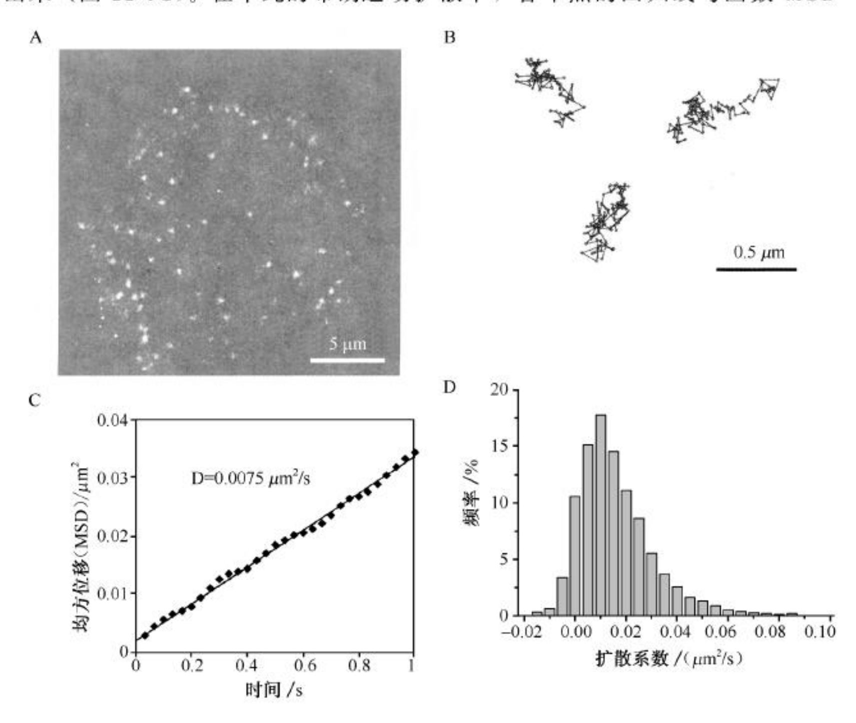



图 11-5　TMR 标记的 cAMP 受体 cAR1 的扩散系数的单分子研究。A. 活黏菌细胞上单个 cAR1 固定在膜上的典型图像。B. 膜上单个 cAR1-TMR 分子在 3 s 内的轨迹的例子。C. MSD 按时间画出来的例子。指示分子运动是由随机布朗运动驱动的线性回归方程写为：$f(t) = 4Dt$，式中 $D$ 代表膜上单分子的扩散系数。D. cAR1-TMR 分子扩散常数的频数分布图。扩散系数是由 33～167 ms的一段时间内 MSD 的值得出的。

呈线性相关，其中 $D$ 代表单分子的扩散系数。这种分析方法的基础知识在其他章节有详细描述（Saxton and Jacobson 1997；Ritchie et al. 2005；Kusumi et al. 2005）。

### 时序性测量

胞内的信号转导过程中经常有激活后胞浆内信号转导蛋白在短时间内被募集到细胞膜上的过程。当信号转导分子被膜上事件固定在膜上时，膜上接收到的信号被转到胞内的下游信号通路。使用 TIRFM 可以显示膜上的时序性的信号转导事件。如图 11-6 所示，动态影像中每一帧里固定到膜上的分子数量都被计数了。在我们的实验中，整体加入 cAMP 刺激后大约 10 s，膜上 CRAC-GFP 的数量增加了，这反映了膜上 PI（3,4,5）P3 水平的增加。时序性观察的总体特点与落射荧光显微镜下观察到的一致，指示这个相同的现象在 TIRFM 下能被成功检出。然而，单分子成像进一步显示了一个单分子的信号转导事件的本质。在施加刺激的过程中，CRAC-GFP 的解离动力学呈现出时间性的改变（图 11-6C）。在刺激前（未被刺激）和在刺激后的一段充分时间（已适应了刺激），解离曲线与两个指数函数的和相符，率常数与极性细胞的背部所观察到的相同。此外，膜上的 CRAC-GFP 分子在应答期间（刺激后）以单个指数函数解离，其中率常数与极性细胞上伪足区域的 CRAC-GFP 相同。这样，跨膜信号转导是由胞浆内信号转导分子的重复的快速结合/解离过程所动态调控的。

## 单分子检测技术的优势

活细胞中也有其他确定解离率或扩散系数的方法。单分子检测技术的优势是它可以直接被用于检测单分子的随机行为及获取分布模式，从分布模式中可以确定分子的一般特性及它们的变化。此外，可以较为容易地考察有着随刺激动态变化的信号转导网络的活细胞内不同部位的分子特性（图 11-4C）（Ueda et al. 2001；Matsuoka et al. 2006）。也可以对随时间改变的刺激后解离动力学进行灵敏的检测（图 11-6C）。此外，TIRFM 可以检测落射荧光显微镜下无法检测到的较次要的事件（图 11-4C）（Matsuoka et al. 2006）。此外，通过检测两个以不同染料标记的分子的共定位或荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET），可以直接观察活细胞内两个信号分子的相互作用（Sako et al. 2000）。

单分子检测技术已在活细胞内各分子行使它们的功能的情况下被应用到多种分子上。这些新技术可以为细胞信号转导的动态行为提供新的视点。必须注意，不能从不再保有完整功能的分子或人工假象处获得不准确的参数，以解释信号转导过程。因此在这一章内，我们特别强调了，必须确认已充分检查荧光标记的分子的功能，以证实单分子的活动，分析是基于关键的控制实验（critical control experiment）。

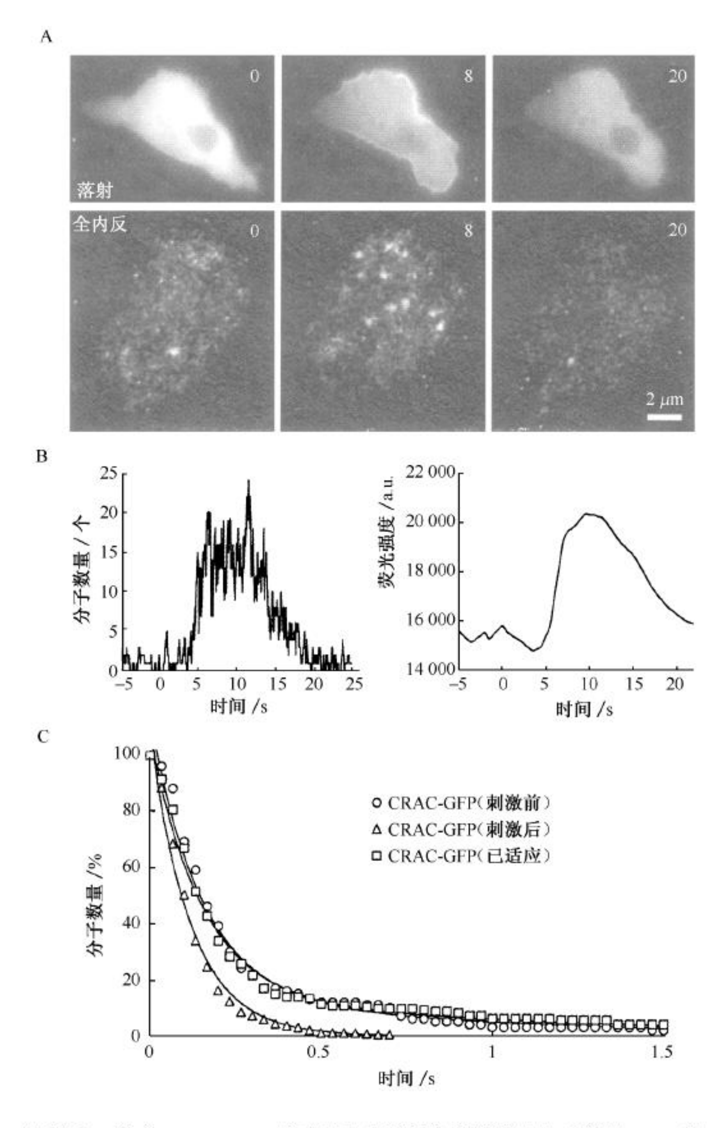



图 11-6　单个CRAC-GFP分子显示的膜结合事件数量的时序图。A. 黏菌细胞内用cAMP刺激后 $t=0$ 时，在落射荧光显微镜下（上图）和TIRFM下（下图）观察的CRAC-GFP图像。B. 由图像测得的CRAC-GFP瞬时募集时序图。由单分子成像（左图）与多分子成像（右图）测得的动力学数值在实质上是相同的。C. 整体增加cAMP刺激前（圆圈）、约20 s（三角）、20 s后（方块）的从膜上解离的CRAC-GFP分子的解离曲线。解离率常数在刺激前为 $6.075\ s^{-1}$ 和 $1.10\ s^{-1}$，在应答中为 $8.33\ s^{-1}$，在刺激后20 s以后为 $6.67\ s^{-1}$ 和 $0.92\ s^{-1}$。(Matsuoka et al., 2006，允许后重印 [© Company of Biologists])

## 致谢

感谢 Dr. J. West 和 Dr. P. Karagiannis 批判性阅读原稿，感谢大阪大学和 CREST 的同事做出的宝贵讨论。本研究由 MEXT's Leading Project，Bio-Nano-Process 资助。

## 参考文献

Axelrod D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2:** 764–774.

Devreotes P., Fontana D., Klein P., Sherring J., and Theibert A. 1987. Transmembrane signaling in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol.* **28:** 299–331.

Dickson R.M., Cubitt A.B., Tsien R.Y., and Moerner W.E. 1997. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388:** 355–358.

Fukui Y., Yumura S., and Yumura T.K. 1987. Agar-overlay immunofluorescence: High-resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis. *Methods Cell Biol.* **28:** 347–356.

Funatsu T., Harada Y., Tokunaga M., Saito K., and Yanagida T. 1995. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* **374:** 555–559.

Hibino K., Watanabe T.M., Kozuka J., Iwane A.H., Okada T., Kataoka T., Yanagida T., and Sako Y. 2003. Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. *ChemPhysChem.* **4:** 748–753.

Howard P.K., Ahern K.G., and Firtel R.A. 1988. Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16:** 2613–2623.

Ide T. and Yanagida T. 1999. An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265:** 595–599.

Iijima M. and Devreotes P.N. 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **109:** 599–610.

Iino R., Koyama I., and Kusumi A. 2001. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* **80:** 2667–2677.

Janetopoulos C., Ma L., Devreotes P.N., and Iglesias P.A. 2004. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 8951–8956.

Janetopoulos C., Borleis J., Vazquez F., Iijima M., and Devreotes P. 2005. Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis. *Dev. Cell* **8:** 467–477.

Kitamura K., Tokunaga M., Iwane A.H., and Yanagida T. 1999. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometers. *Nature* **397:** 129–134.

Kusumi A., Nakada C., Ritchie K., Murase K., Suzuki K., Murakoshi H., Kasai R.S., Kondo J., and Fujiwara T. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34:** 351–378.

Manstein D., Titus M.A., De Lozanne A., and Spudich J. 1989. Gene replacement in *Dictyostelium*: Generation of myosin null mutants. *EMBO J.* **8:** 923–932.

Matsuoka S., Iijima M., Watanabe T.M., Kuwayama H., Yanagida T., Devreotes P.N., and Ueda M. 2006. Single-molecule analysis of chemoattractant-stimulated membrane recruitment of a PH-domain-containing protein. *J. Cell Sci.* **119:** 1071–1079.

Miyanaga Y., Matsuoka S., Yanagida T., and Ueda M. 2007. Stochastic signal inputs for chemotactic response in *Dictyostelium* cells revealed by single molecule imaging techniques. *Biosystems* **88:** 251–260.

Parent C.A., Blacklock B.J., Froehlich W.M., Murphy D.B., and Devreotes P.N. 1998. G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* **95:** 81–91.

Ritchie K., Shan X.Y., Kondo J., Iwasawa K., Fujiwara T., and Kusumi A. 2005. Detection of non-Brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophys. J.* **88:** 2266–2277.

Sakmann B. and Neher E., eds. 1995. *Single-channel recording*, 2nd ed. Plenum Press, New York.

Sako Y., Minoguchi S., and Yanagida T. 2000. Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* **2:** 168–172.

Saxton M.J. and Jacobson K. 1997. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26:** 373–399.

Tokunaga M., Kitamura K., Saito K., Iwane A.H., and Yanagida T. 1997. Single-molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235:** 47–53.

Ueda M., Sako Y., Tanaka T., Devreotes P.N., and Yanagida T. 2001. Single-molecule analysis of chemotactic signaling in *Dictyostelium* cells. *Science* **294:** 864–867.

Vazquez F., Matsuoka S., Sellers W.R., Yanagida T., Ueda M., and Devreotes P.N. 2006. Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 3633–3638.

Watts D.J. and Ashworth J.M. 1970. Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119:** 171–174.

Wazawa T. and Ueda M. 2005. Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **95:** 77–106.

Xiao Z., Zhang N., Murphy D.B., and Devreotes P.N. 1997. Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J. Cell Biol.* **139:** 365–374.

（詹旻野　译）

# 第12章　离体和在体的荧光相关光谱术

**Elke Haustein　Petra Schwille**

Bio Tec TU Dresden, Biophysics Group, Tatzberg 47-51, D-01307 Dresden, Germany

## 摘要

30多年前建立起来的荧光相关光谱术（FCS）提供了用高的空间和时间分辨率来分析极稀生物活性分子溶液的手段。以大量的不同的技术应用为特色，无论是基于调查用的采样，还是与其他方法结合的潜力上，均证明了FCS是一个高度通用的技术。有别于其他的基于荧光的技术，它不是用来分析平均的发射强度，而是用来记录由于热平衡中自发的偏离分子所引起的瞬间强度波动。这些波动的原因可能来自于各种因素的变化，如局部的浓度和流动系数，甚至于在纳摩尔浓度水平上荧光标记生物分子的典型的分子间或分子内反应，不管是离体还是在体条件下。本章将对FCS做一个基本介绍，包括建立的原理、离体的数据采集和分析。此外，还讨论了这个技术用于在体测量的潜在可能性。

## 概述

在过去几年，对更好的微创诊断工具和更加专业化的用来解答专门的生物学问题的仪器的需求持续增加，推动了以荧光为基础的技术的发展。荧光相关光谱术（FCS）是一个对极稀溶液的生物活性分子具有高空间和时间分辨率的良好的分析方法。就样品制备和光学装置来说，FCS是一个比较灵活的方法，而且其光学设备可以很容易地与其他显微技术相结合。一直以来，在生命科学领域中FCS作为一个标准的单分子技术被人们所接受。FCS基本的概念是分析由周围环境温度热平衡中的随机离均值引起的小分子组合中的自发波动。所有影响荧光信号的物理参数的波动也因此很容易被FCS甄别。这些波动包括局部浓度、流动系数，甚至于荧光标记生物分子在纳摩尔浓度水平上的分子间或分子内反应的特征速率常数，不管其是离体还是在体条件下。

## 技术发展的概要

通过Brown对粒子随机运动的观察，以及在20世纪初Einstein和Smoluchowski的分析（Smoluchowski 1906），FCS的建立主要依赖于分子扩散理论的发展。FCS作为一门技术是在20世纪70年代初期作为一个“小型化”的动态光散射而发展起来的(Magde et al. 1972, 1974; Elson and Magde 1974)。就传统技术而言，FCS概念新颖之处就是利用物理参数的瞬间自发波动，包括样品分子荧光发射的波动。FCS首次用来衡量扩散和DNA药物插入的化学动力学的测量（Magde et al. 1972)，大量的研究致力于调查粒子的浓度和迁移率，如三维和二维的扩散（Aragon and Pecora 1976; Fahey et

al. 1977）或层流（Magde et al. 1978）。为试图限定这个系统调查到小分子的数目，既要提高探测的灵敏度又要增强背景抑制度，Rigler及其同事们将FCS与共焦检测结合在了一起（Rigler and Widengren 1990；Rigler et al. 1993）。

自Rigler及其同事们的开创性工作以来（Eigen and Rigler 1994；Schwille et al. 1997a），FCS在生命科学分析和诊断中的潜力已经在大量的应用中被证实。FCS已成功用于研究核酸间（Kinjo and Rigler 1995）和蛋白质间（Rauer et al. 1996）的结合和分解。此外，也用于研究众多的诱导单个染料分子的荧光产量波动的环境效应，包括可逆的质子（Haupts et al. 1998）、电子转移、氧气和离子浓度。

采用双色互相关方案可同时观察不同的荧光种类（Scheille et al. 1997b），使检测两个分子结合和分解过程的特异性显著提高。结合极短的数据采集时间，甚至允许对酶动力学的实时研究（Kettling et al. 1998）。在非常早期的阶段还报道过细胞测量（Elson et al. 1976）。然而，在混浊的介质中，尤其是（虽然也不完全是）在细胞的一侧，信噪比受到自发荧光和散射的严重影响。不仅如此，光漂白作用可能会导致细胞内本已有限的标记分子不可逆转的消耗。

双光子激发（TPE）固有的深度辨别力，暗示其可作为一个潜在的解决方案（Denk et al. 1990）。早在1995年已报道了第一个双光子FCS细胞实验（Berland et al. 1995），但直到4年后才达到单分子的灵敏度（Schwille et al. 1999）。通过双光子诱导过渡到激发态展示的选择规则不同于那些相应的单光子，这使得同时激发光谱特性不同的染料成为可能（Heinze et al. 2000，2002，2004）。

第一台商业仪器在1996年由Carl Zeiss（ConfoCor）出售，提供第一个成套的FCS应用软件并促使FCS发展成为一个标准的技术。这些仪器很快扩展到允许双色关联，稍后结合了激光扫描模块，最近又装备了可选择的TPE（Weisshart et al. 2004）。目前，全世界许多细胞生物学研究组都在从事应用原位动态荧光探针进行细胞内FCS探测。不过，包括组织和机体发育，这个令人感兴趣的生物系统的复杂性也同时引发了属于FCS概念的光学方法的发展和改进。

## 染料选择

通过使用荧光观察感兴趣的分子，可以实现FCS的高敏感性。但不幸的是，大部分生物系统内在环境都很昏暗。如果有人决定使用荧光分光镜，那么最重要的是选择正确的荧光标记。一个好的荧光团平均可以在失效前（如光漂白）经受$10^5$次激发循环。为了得到良好的结果，我们需要在正确的波长范围内选择耐光荧光团。然而更重要的是，荧光特征和生物相关现象之间存在明确的差别，故需要通过正确实验控制来实现。过去的10年里，随着荧光技术对生命科学领域影响的增大，用于蛋白质标记的技术和工具得到了极大的改进。例如，自荧光蛋白可以通过基因融合参入，从而保证最大标记效率和内在生物兼容性。应用不同的功能基团，可以各种新型的耐光生色团适应于广泛的使用条件，从紫外到近红外。此外，介质物理学的新发展使得开发新的荧光系统成为可能，即半导体纳米晶体，也被称为“量子点”。

对荧光染料的选择可以受到激光和相应过滤系统的限制。对单色设备来说，几乎所

有的波长都可以使用。在使用紫外或红外光波实验前，要检查探测器的灵敏度和相关光学设备的透射曲线，多色设备则需要生色基团具有较好的可区分性（即有最小光谱重叠），这取决于发射光谱和所选过滤器的形式。然而依据经验，建议发射强度的峰值至少有100 nm的差异（越大越好），一个典型的合成染料结合是 Alexa488-Cy5（Alexa647更好）。绿色荧光团亲水性好，对溶液的测量有理想的效果，而 Cy5 不仅亲水，而且也展现出非常复杂的光学特性。

## 自荧光蛋白

最初，由 Shimomuraet（1962）从水母的发光器官分离出的绿色荧光蛋白。相对于其他合成蛋白质具有一种独特的优势：这种蛋白质或更重要的绿色荧光聚合蛋白，可以通过基因转导进入细胞，并在原位得以表达。野生型蛋白质分别表现出对 395 nm 光的吸收性和对 509 nm 光的发射性。蛋白质结构的改变会影响激活和发射的特性，因此可以获得多种不同的波长（BFP，蓝色荧光蛋白，到红移绿色荧光蛋白）。遗憾的是，荧光激活也激发构象从生色向非生色状态转变。这个过程的转化率依赖 pH，可导致信号转导。在分析 FCS 曲线时必须要考虑这一点。

在体检测过程中人们对红色光谱区的荧光蛋白比较感兴趣，因为大多数细胞在较长波长下减少了自发荧光量。另外，这些蛋白质对多色结合基团十分有帮助。Matz 等（1999）从 Anthozoa（珊瑚动物）中发现了新型类 GFP 蛋白。其中的一个起源于 *Discosoma* sp. 珊瑚，现又名 DsRed。其最大发射波长是 583 nm。遗憾的是，所有 Anthozoan 类 GFP 蛋白至今表现出低聚物特征（Baird et al. 2000）。虽然低聚物并不妨碍它们表现基因型和标记细胞，但是却影响它们在分子蛋白组学中的研究。因此，单显性的形式更受欢迎（如 mRFP1 或 tdimer2 [12]）。至今为止，在荧光蛋白中能够发射最大波长的蛋白质是 eqFP611（611 nm，克隆自海葵）和各种 DsRed 突变种（如 mRFP1，607 nm），或者更风趣地被称为 mTangerine（585 nm）、mStrawberry（595 nm）和 mCherry（610 nm）（Shaner et al. 2004）。PRI（phytofluor red）和除去蓝藻光敏色素 1 的强荧光胆蛋白，最大发射波长约为 670 nm，可能是一种有前途的远红外选择（Miller et al. 2006）。

## 有机生色基团

令人遗憾的是，所有已知的荧光蛋白相对较大（单体约 27 kDa）。因此这些标记在外形上类似其所标记的蛋白质。如果标记的大小对结果有影响，那么最有发展前景的小标记是有机荧光团，如荧光素和玫瑰精。这些物质不仅经济易得，而且改进了类似 Atto 和 Alexa 染料家族（ATTO-Tec，体外分子探针）的衍生物。这些物质有较广的激活和发射波长，典型质量小于 1 kDa。这些特征可以减少位阻现象。使用不同的精选蛋白质标记技术，这些标记能被放到蛋白质的特定位点。近来，降低了三重振幅的生色基团显色也有了良好发展。据报道这些物质具有更好的光稳定性（Donnert et al. 2007）。

## 量子点

近几年，一种新的荧光标记逐渐得到了更多的关注：半导体纳米晶体。这些所谓的

量子点是纳米半导体颗粒，其核心直径为 2～10 nm，这大体上与典型的荧光蛋白尺寸相当。它们不仅具有很好的耐光性，而且提供窄且对称的发射光谱，这就保证了多色测量中的灵活性，且做到最小光谱叠加。另外，它们的两光子跨断面活动（two-photon action cross-section）比传统的有机荧光团高 2 或 3 个数量级，并且没有显著的波长依赖性。虽然它们缺少的生物兼容性很大程度上限制了它们的应用，但表面涂层化学的进步帮助克服了这些困难，从而允许这些晶体用于长期、多色的活细胞成像（Jovin 2003; Jaiswal et al. 2003）。它们复杂的促发特征可以在一定程度上被均匀分布（Hohng and Ha 2004），故在细胞中不特别突现。

### 单光子激发与双光子激发

对双光子（TPE）或多光子激发（MPE）来说，一个分子必须同时（$10^{-15}$ s 之内）吸收两个（多个）比单光子激发中更长的波长。对于同一波长的光子，跃迁概率与强度成比例。只有高光子流（典型为 $10^{31}$ 光子/$cm^2$）照射高吸收系数材料（大约 $10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$），才可以确保此类三粒子事件有较好的发生概率。因此通常需要脉冲激发来获得足够高的光子密度。三粒子指的是双光子激发条件。双光子诱导激发到激发态，这虽然不对称，却表现出不同的选择规则（Lin et al. 1984）以及电子振动与放射光谱的耦合。但电子振动没有显著改变放射光谱。这说明不能简单地从单光子光谱中得到 TPE 光谱中所选的染料。真正的光谱往往明显向蓝光方向移动。然而，根据 Kasha 法则，激发谱独立于激发的方法和波长，大体上是相同的。如果同时观察多种分子，在使用单 IR 激光束时，单分子的双光子，甚至三光子激发概率使 FCS 变得简单（Heinze et al. 2000，2004）。

MPE 的主要优点是提高了分辨率、加宽了激发谱、极少的三粒子闪烁（triplet blinking），以及在可见光谱中缺少喇曼散射。对于在体测量来说，焦点以外的光漂白和高穿透深度是必须被提及的。然而，在激发范围之内的光漂白被极大地加强。另外，足以激发荧光的激发能量与破坏细胞器的最低能量逾限非常接近。基于生色基团，整体信噪比可能仍然减少：尽管 GFP 之间几乎没有差异，Cy5 在 MPE 情况下极易发生光漂白，从而失去使用价值。

## 数据分析

### 理论概要

#### 自相关

在周围环境温度下，来自于焦点激发分子的荧光信号微小波动通常发生，它们通常被视为测量信号中的噪声特征。然而，这些波动可以通过对记录的信号强度进行自回归，实现强度和持续时间的量化。自回归分析为时间序列信号的自似性提供了测量办法，因此能够描绘其所携带的持续信息。控制分子活动过程所携带的基本信息能够从荧光波动的衰减特征中得到。定义荧光波动 $\delta F(T)$ 与信号 $F(t)$ 的标准自回归方程如下：

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \qquad (1)$$

对于

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \text{ 和 } \langle F(t) \rangle = \frac{1}{T}\int_0^T F(t)\mathrm{d}t \tag{2}$$

式中，信号 $F$ 为在时间 $t$ 与在时间 $t+\tau$ 的值相乘的暂时平均值。随着已测粒子的增多，$\delta F(t)$ 变得更小。在观察范围内减少分子数量非常重要。平均粒子数量为 0.1～1000（体积为 1 fl），即浓度在亚纳米级和亚微米级之间。最常见的观察模型是由 Aragon 和 Pecora（1975）发现的简单三维 Guassian 面。这是对共焦机构的良好近似。在放射方向上，$r_0$ 为半径 $1/e^2$，$z_0$ 是轴的方向，有效焦点 fanwei 可以被定义为 $V=\pi^{3/2}\times r_0^2\times z_0$。或者，由 Berland 等（1995）提出的 Gauss-Lorentz 模型可用来描述观测量，可以对 TPE 中的观测量进行更好得估计。

**互相关**

使用自相关分析，就是将测量的信号与自身相比，着重突出隐藏的暂时模式。当在两个独立的测量信号 $F_i$ 和 $F_j$ 中寻找共同特征时，我们不仅希望去除探测器产生的噪声（如所谓雪崩光电二极管的后脉冲），而且希望得到更高的探测特异性。对公式（1）推广后得到标准化的交叉回归如下：

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t+\tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle} + 1 \tag{3}$$

对于双色荧光互相关的光谱，相同探测元件内两种非常不同的染料被激发，用于探测不同种分子间的交互作用。在理想条件下，两通道都有相同的有效范围 $V_{eff}$、完全分离的光谱以及可以忽略的发射-吸收重叠。由此可以推导以下相关曲线：

自相关：

$$G_{i,j}(\tau) = \frac{(\langle c_{i,j} \rangle) M_i(\tau) + \langle C_{ij} \rangle M_{ij}(\tau)}{V_{eff}(\langle C_{i,j} \rangle + \langle C_{i,j} \rangle)^2} \tag{4}$$

互相关：

$$G_x(\tau) = \frac{\langle C_{ij} \rangle M_{ij}(\tau)}{V_{eff}(\langle C_i \rangle + \langle C_{ij} \rangle)(\langle C_j \rangle + \langle C_{ij} \rangle)} \tag{5}$$

式中，$M_{ij}(\tau)$ 为相关函数的运动相关部分；$C_{i,j}(r,t)$ 为单标签信号 $i$、$j$ 的密集度；$C_{i,j}(r,t)$ 为双标签信号的密集度。更复杂的情况下，交叉回归方程的振幅与双标签粒子浓度直接成比例（Weidemann et al. 2002；Hess et al. 2002）

$$\langle C_{ij} \rangle = \frac{G_x(0)}{G_i(0) \cdot G_j(0) \cdot V_{eff}} \tag{6}$$

非特异性交叉作用（以及基于此的探测通道不完整分离）主要来自短波染料发生的长波激发。就像所做的不同亮度种类分子的情况，决定双探测通道的相关发射信号可以由以上理论来解释（Scheill et al. 1997b），但这会导致互相关曲线的非零振幅，甚至在双标签分子缺失的情况下。因此，这也可以解释非交互条件下的交叉相关函数振幅，从而可以决定互相关测量的偏移量和校正动态范文。

## 拟合函数

**转移扩散**

假设单种和三维高斯元件只有转移扩散，我们可以得到以下自回归方程：

$$G(\tau)=\underbrace{\frac{1}{V_{\text{eff}}\cdot\langle C\rangle}}_{=\frac{1}{\langle N\rangle}}\cdot\left[\frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_D}}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\frac{r_0^2}{z_0^2}\cdot\frac{\tau}{\tau_D}}}\right] \tag{7}$$

首先，一个分子在焦点范围内的时间，即径向扩散时间 $\tau_D$ 可以用装置独立扩散系数 $D$ 来表示

$$\text{OPE}: \tau_D=\frac{r_0^2}{4\cdot D} \tag{8}$$

$$\text{TPE}: \tau_D=\frac{r_0^2}{8\cdot D} \tag{9}$$

知道粒子特性后，可以从扩散系数推导出局部黏性。而扩散系数与介质的黏性成反比

$$D_i=\frac{kT}{6\pi\eta R_{h,i}} \tag{10}$$

式中，$R_{h,i}$ 为粒子的流体动力学半径；$T$ 为温度；$k$ 为波尔兹曼常数。如果 $R_{h,i}$ 未知，则黏性可通过对比研究得到。或者说，对于恒定的黏性和温度，扩散系数与流体动力学半径成反比。$z_0/r_0$ 为波形系数 $\omega$ 或结构参数 $S$，反之，上式中第一个参数是焦点范围中平均粒子数的倒数。因此，只要直径 $r_0$ 和 $z_0$ 已知，局部荧光分子浓度就可以由自相关曲线的振幅 $G(0)$ 精确地决定了。

二维高斯观察量的自相关方程是公式（7）在 $z_0$ 趋向无穷大时的情况

$$G_{2D}(\tau)=\frac{1}{N}\cdot\frac{1}{1+\tau/\tau_D} \tag{11}$$

如果没有相互作用的种类多于一种纯扩散粒子，针对多类粒子的自相关方程可以通过对各独立成分进行加权得到

$$G(\tau)=\frac{\sum_{i=0}^{n}\hat{G}_{ii}(\tau)}{\left[\sum_{i=0}^{n}[\eta_i\cdot\langle C_i(\underline{r},t)\rangle\cdot V_{\text{eff}}]\right]^2}=\sum_{i=0}^{n}\frac{[\eta_i\cdot\langle C_i(\underline{r},t)\rangle]^2}{\left[\sum_{i=0}^{n}[\eta_i\cdot\langle C_i(\underline{r},t)\rangle]\right]^2}\cdot G_{ii}^{\text{diff}}(D_i,\tau)$$

$$=\sum_{i=0}^{n}\tilde{I}_i^2\cdot G_{ii}^{\text{diff}}(D_i,\tau) \tag{12}$$

式中，$\eta_i$ 为 $i$ 类分子的亮度；$G_{ii}^{\text{diff}}(D_i,\tau)$ 为 $i$ 类分子扩散的自相关方程。

$$G_{ii}^{\text{diff}}(D_i,\tau)=\frac{1}{\langle C_i\rangle\cdot V_{\text{eff}}}\cdot\frac{1}{1+(4\cdot D_i\cdot\tau)/r_0^2}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+(4\cdot D_i\cdot\tau)/z_0^2}} \tag{13}$$

$i$ 类亮度比作为平方后的权重系数

$$\tilde{I}_i=\frac{\eta_i\cdot\langle C_i(\underline{r},t)\rangle}{\sum_{i=0}^{n}[\eta_i\cdot\langle C_i(\underline{r},t)\rangle]} \tag{14}$$

因此，用于各种不同独立扩散粒子的自相关方程仅仅是相关方程的加权和，加权系数为强度比的平方（即亮度乘以标准化浓度，而浓度的标准化则经过用样本中所有种类粒子该参数的加和）。大多数情况下，相对亮度值由独立的测量决定。在交互作用明显或者黏合物中明度变化存在的情况下，一个类似的表达可以被用来描述互相关。

**单分子反应**

至今为止，我们仍然假设发光基团的荧光特性不会因其穿越激光焦点而改变。遗憾

的是，这个假设对于真染料和高激发能量不成立。这种荧光强度的跃迁最普遍的原因是染料被转移到第一三重激发态。因为这种转移在量子力学理论中不可能发生，生色基团需要相对长的时间来恢复到基态。在此时间间隔中，染料不能发射出任何荧光光子，因此看上去是暗的。事实上，我们可以想象系统间过渡的现象，即一系列暗间隔打乱原本分子在其照亮路径上连续发射的荧光。三重明暗闪烁呈现出典型的简单指数衰竭

$$G_{\text{unimol}}(\tau) = G_{\text{diff}}(\tau) \cdot G_{\text{triplet}}(\tau) = G_{\text{diff}}(\tau) \cdot \left[ 1 + \frac{T}{1-T} \cdot e^{-\tau/\tau_{\text{triplet}}} \right] \quad (15)$$

## 相关类型

得到 FCS 曲线所使用的相关是数字化的，它允许对输入的信号直接计算相关方程(即单光子的数量由探测器每单位时间记录一次)。最常见的相关子类型是线性 τ、指数 τ 和多元 τ。大多数硬件相关子属于最后一类。然而，如果使用软件相关子，我们就有一个选择。如果加工时间少于取样时间，这种方法被称为实时相关子。Kojro 等(1999) 讨论了这方面的更多细节。不同图解绘于图 12-1 中。

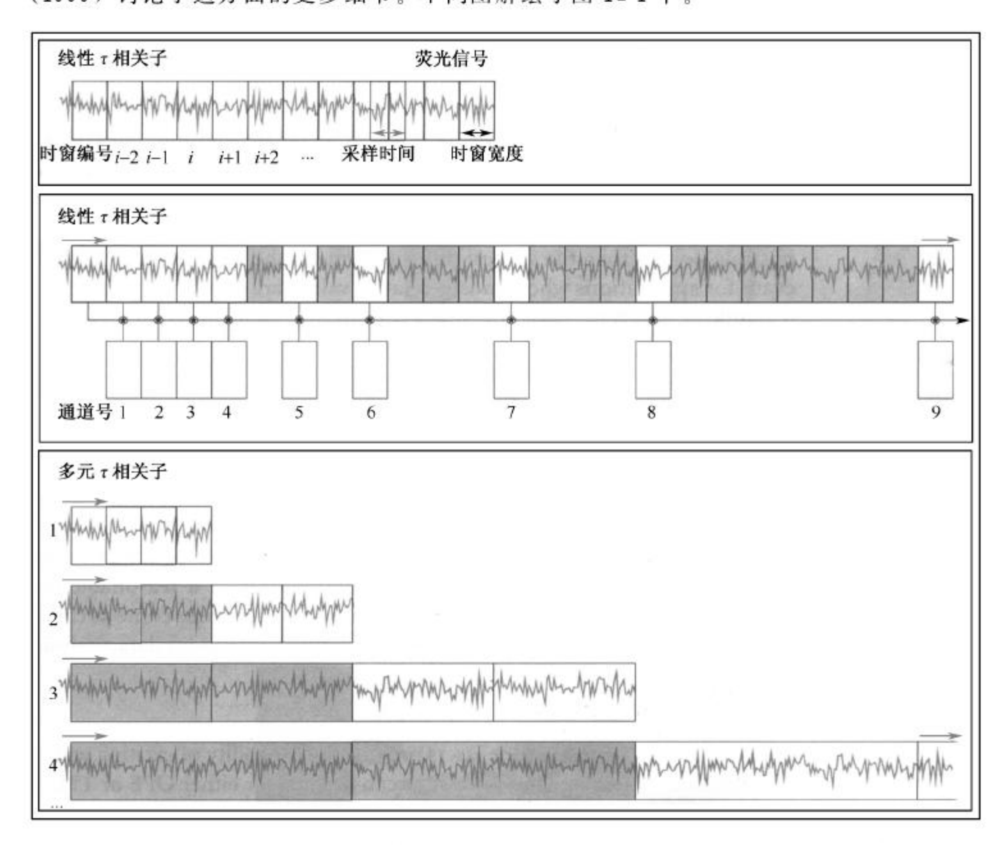



图 12-1 相关子构造：不同相关子的例子：(顶部) 线性相关子、(中间) 指数 τ 和 (底部) 多元 τ 相关子。然而前两者的特点是具有相同时间格，后者每步都呈指数增长。灰色格被丢弃，其他的格保留用于建立带指数隔离数据点的相关方程。

相关方程最直接的计算是“强力法”。这种方法直接基于公式（1）的定义。记录的信号被分为 $N$ 格。已知 $n_i$ 是宽 $t_i$ 的 $i$ 格中的光子数，相关方程建立

$$G_k = \frac{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=0}^{N} n_i \cdot n_{i-k}}{\left[\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=0}^{N} n_i\right]^2} \tag{16}$$

这里，相邻通道之间的取样时间（即格宽 $t_i$）与延迟时间相同。这种方法简单且直接，但大量消耗时间和存储空间，因此不适合做长时相关。尽管在对数时间表上，传统的线性 τ 相关有充足的计算数据，但该相关需要大量通道来覆盖大范围延迟。大体上，只有少量指数分隔的延迟时间被用到。作为一种折中的办法，当所有格宽相同时，可以使用指数 τ 相关。但是只有一些移位寄存器被真正使用，其他都只用于固定延迟线。这种办法的主要好处是得到的曲线有统一的噪声：每个延迟的数据点都从同样数目的格中得到，而这些格又有相同的宽度。

最后也是最常见的是多元 τ 相关子。这里，人们大量使用了线性分隔延迟时间，但以每个连续组为特征的取样时间以 2 为因子增长。导致延迟时间以准指数形式被分隔，覆盖大范围的延迟时间。然而，长延迟时间的数据从大时间格中取平均值而得，使得长相关时间的曲线更加平滑。与常见硬件相关子所用的对称标准化程序的结合，可以导致线性 τ 相关子曲线出现偏离，特别是对长相关时间而言（即扩散）。减少多元 τ 误差最好的办法是增加总的测量时间。为了达到与线性 τ 相关子中相似的统计误差水平，测量时间必须增加 2500 倍。这与经验法相符，即总测量时间应该比样品最短扩散时间大几个数量级（至少 3 个）。技术的应用只关注最相关的价值或其他主要误差来源。尽管这些误差可能与应用不相关，但对于高精测量，这些应该被考虑在内。

## 实验装置

一个定制的 FCF 装置可以被看做几个光学部件（图 12-2），更好的装置底部有倒置显微镜，用一侧的门实现 FCS 探测。然而，所有激光扫描显微镜也提供商业 FCS 装置，或是单排陈列，或是加载模块，与共焦成像单元结合。这个领域的新研究者，或是没有较好物理背景的研究者，通常被鼓励买这些商业装置。这些完整的包含有必要的硬件和软件，可以支持后面的数据分析。

### 组成

不同种单模式激光提供了激发连续波或者脉冲的能力。这种条件可以被 OPE 或 TPE 使用。大体上而言，光束可以组合而形成多色光。光强可以由中性密度纤维或者声-光调节纤维调节。对于通常染料系统的连续波激发，可以使用 Argon 或 Argon-Krypton 离子激光或电晶体激光。便宜一些的选择包括氦氖单线管或激光二极管。大体上，平行激光束和高斯束剖面图（TEM00 中的单模式激光）的一个或更多色光通过分光镜射入水浸物体背部的孔径，该孔径数值很大（理想情况是大于 0.9，一般是 1.2），虽然我们能够得到有高 NA 值的油浸物体，但当聚焦多于几微米的水溶液中时，介质和

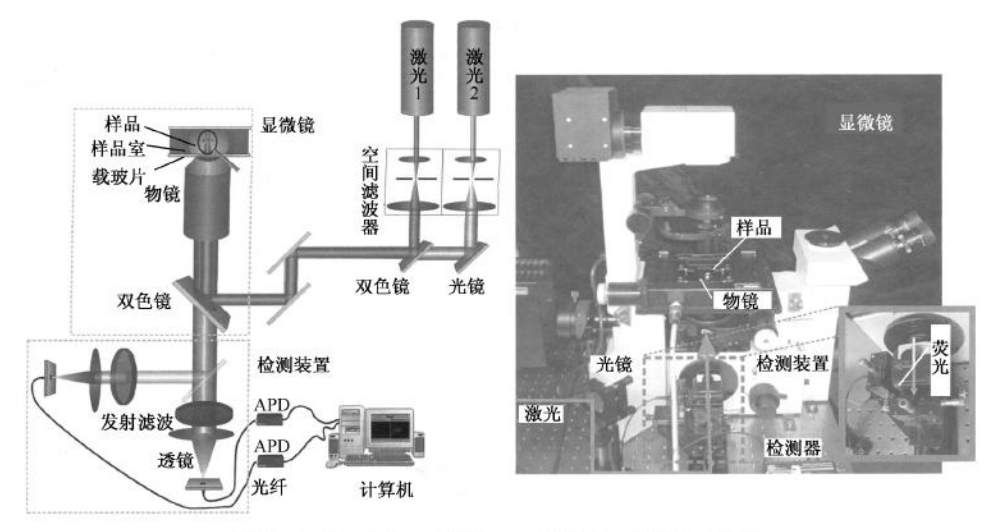



图 12-2　实验装置：双通道 FCS 装置的示意图和实物图。

样品折射率的差异可以导致体积元件严重歪曲。然而对于 TPE，后孔被全遮满，用来制造一个受限衍射的焦点，直径大约 0.5μm（取决于波长）。对于 OPE，则只需遮住 2/3 来实现像差最小化。光束剖面可以通过空间过滤校正。为了减少光选效应，线偏振激光可以通过 1/4 波片转化为圆偏振光。

来自样本的红移荧光由同个物体收集，并通过二极或发射纤维发射。这些纤维与所观察的染料相适。一个位于成像平面上的直径不一（一般是 30～100 μm），共焦孔确保了轴分辨率。Rigler 等（1993）、Hess 和 Webb（2002）具体讨论了针孔尺寸的最优解。出于方便的考虑，如果多模式光纤进入孔核心的直径尺寸合适，针孔可以由此替代。对 MPE 来说，由于内在轴切片，不需要附加的针孔。

为了探测荧光，可以使用有单光子敏感性的 APD 的光电倍增管。传统上，最好的选择是 PerkinElmer 的单光子雪崩二极管（SPAD）。同时，大量其他公司（如意大利的 MPD，Bolzano）提供对红光谱量子效率稍低的类似探测器。但其对蓝光谱区域有更高的量子效率且转置的反应时间得到了改进。因此，这些探测器也许是对荧光寿命探测的可靠替代手段。

探测信号通过带有准对数时滞的多 τ 硬件相关子（Schatzel 1987；Schatzel et al. 1988）进行相关处理（如德国 ALV，Langen 的 PC 卡；新泽西 correlator. com，Bridgewater 的 USB 卡），或者使用软件相关（Magatti and Ferri 2001，2003；Weisshart et al. 2004）。后一种选择从多种算法中得益，它能使实验噪声分布更加平均，且更适合做后续数据分析（Kojro et al. 1999）。数据评估由 Levenberg-Marquatdt 法求得相关曲线的非线性最小平方拟合度。在商业系统中，特殊数据评估程序已整合于软件中。按经验看，数据获取时间应该大于最长时间成分 3 个数量级以上，这样才能被分辨。对于相对静止的膜束缚分子来说，这时间可以变得非常充足。因此，可能需要附加队列控制（Kaushalya et al. 2005）。

## 调试

对于每次测量，FCS 装置必须仔细调整以确保强度分布在焦点范围内，尽可能地与理论模型相近，然后才由三维高斯模型完成近似。如果这个假设不被满足，实验曲线仍然能被这个模型过滤，但得到的参数就失去了意义。

一旦选择了正确的生色基团，也就选择了激发激光和后来的过滤系统，以及物镜。虽然可选的数目可能不同，但这一步对商业和定制装置都是一样的。过滤系统最关键：对于单色装置，需要对激光波长有高反射，对荧光有高传播一致性的分色镜。为了进一步分离激发和发射，需要额外的探测过滤器。带通过滤器可以压制更高波长光的喇曼散射，是很好的选择。使用 Alexa 488 和 488 nm Argon 离子激光，495 dc 分光镜可以同 D525/50 带通过滤器结合。光纤特性的介绍可参看 Reichman (1998)。

在增加光学成分后，激光束必须与显微镜按分光镜反射方式偶联，使物镜背面小孔在中心垂直。在商业装置中，这些已经被解决了。在定制的装置中，激光在到达显微镜之前必须经过两面调整镜。当一个荧光样本（染料样本或染色的塑料片）被放到了载物台上后，一个荧光点变得可见。这个点必须被置于视野中心。依赖实验条件，各种技术可以达到这个目标。最简单的一种包括调整可变镜，这个程序称为“光束行走”。首先，用后面的镜子找到最亮点的位置。选择一个方向，将光点移向中心，直至其几乎不可见。用第二面镜子再次找到最亮点。这个程序反复进行直到中心焦点最亮，且该亮点一旦偏离中心就迅速暗淡。然后，调整小孔或光纤口。在商业和家用系统中，首先在 $x$ 和 $y$ 方向重复调整共焦小孔，找到能使探测器回到最大强度的位置。这之后，对 $z$ 方向进行同样操作。这样做会导致强度分布太广泛从而使最优位置可能变得不明显。程序按 $x$-$y$-$z$ 的方式重复直到达到最大荧光强度。最后调整中检查正确环的位置。通过记录已知特性的生色基团的自相关曲线，可测试前述调整。如果曲线与正确的模型拟合良好，则说明之前的调整是有效的。结构参数在 4 和 6 之间（OPE）或 3 和 4 之间（TPE）且分子亮度足够高，否则就必须从头开始。利用激光能量和后来使用的缓冲溶液调整系统是一个比较好的办法。否则观察范围在实际测量中会变得不同，从而导致校正失效。

最基本的 FCS 装置只包括一个激发波长和一个单探测通道。然而，记录的数据展示了局部浓度的大量信息、静止参数，甚至光物理或化学反应。通过使用第二个探测通道，我们可以有效地减少虚探情况。dcFCC 允许对样本中两个不同的区域进行比较。为了添加两个激发激光束，可以使用有内在重叠多线激光（Winkler et al. 1999）。然而，更简单的控制，是两个独立的激光束由附加的分光镜添加，或共同进入光纤而形成偶联。

探测通道可以用分光镜和特点探测纤维分隔。对一个通道而言，调整步骤大体是一样的。首先都是激光束的重叠，随后调整激发范围到中心。定制探测通道的重叠部分则用肉眼检查。使用短波生色基团的光谱交互作用调整长波探测通道，实现最大重叠：自相关和交叉相关曲线应该完全重叠。当长波激光打开时，相关探测通道的调整步骤不需改变。评估调整质量的好方法是使用参考样本（如标记效率未知的双标签生物分子，或者带有多荧光类型的合成颗粒）。

与从图像技术获得的数据不同，相关曲线的解释不是凭直觉的。有意义的参数必须通过使用正确数学模型拟合曲线才能得到抽提。这可能会随着研究中生物系统的改变而改变。对于水溶液中自由扩散的染料分子来说，一个包含一种扩散分子的模型和一个描述各种三重闪烁的参数就足够了［公式（15）］。大多数商业系统提供自带的软件，但我们也可以使用带非线性最小平方拟合程序（Levenberg-Marquardt）的数学软件（如Origin、Igor，或者更精细的MatLab）。为了评估拟合度，计算拟合过程中的 $\chi^2$，同时考虑残差。小 $\chi^2$ 值说明拟合度更好，但残差值的大小（即计算得到的拟合曲线同实验数据之间的差值）是更简而易见的标准。残差应该在零附近对称且均匀地分布，反映出不带有残差结构的随机小偏差（图 12-3）。我们甚至可能计算残差与显著的周期小偏差的相关，否则后者也许不会引起我们的注意。

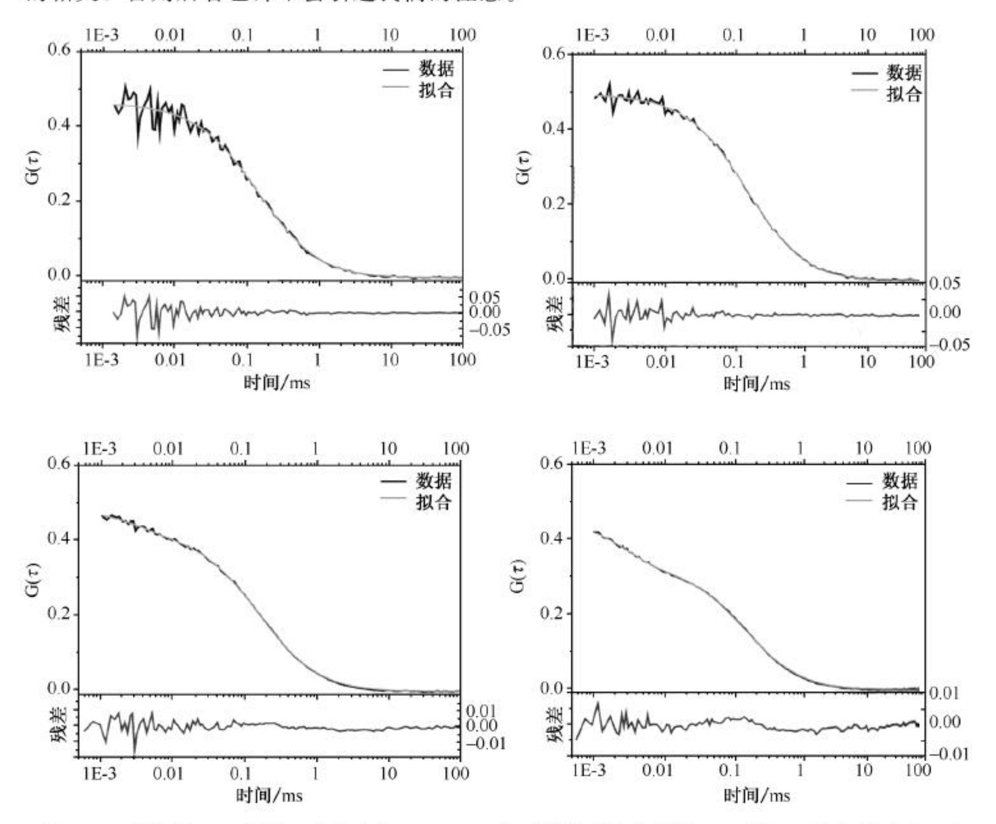



图 12-3　拟合的 FCS 曲线：水溶液中 Alexa488 的不同的自相关曲线。（顶部）：虽然信噪比（左上）不是很好，但曲线表现出良好的拟合度，且残差对称地衰减到零。（底部）：拟合度开始变差（左下），但残差的波动是不会错的（右下）。

## 校正

扩散系数 $D$ 可以从前述相关函数［公式（8）和公式（9）］的特征衰减时间中推导出来。然而，所有参数紧紧依赖于观察范围的几何参数，即 $r_0$ 和 $z_0$，但这两者不能直接得到（Enderlein et al. 2005）。确定这两值最常见的方法是使用已知扩散系数的荧光团来校正。从 FCS 曲线的拟合过程，我们可以得到结构参数和扩散时间。因此，我们也可得到有效观察范围的轴向和径向尺寸。对于 OPE，我们可以得到

$$r_0 = 2 \cdot \sqrt{D \cdot \tau_D}$$

$$z_0 = \omega \cdot r_0 \tag{17a ~ c}$$

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \cdot \omega \cdot r_0^3 = 8 \cdot (\pi \cdot D \cdot \tau_D)^{3/2}$$

罗丹明 6G 的扩散系数是 $2.8\times10^{-6}\ cm^2/s$，尽管这个数据精确度只有 25%（Magde et al. 1974），它仍被广泛用来作为校正标准。更多最近的独立测量方法提示一个稍高的值［如 $D_{Rh6} = (4.14\pm0.01) \times10^{-6}\ cm^2/s$（Culbertson et al. 2002）］。对于多通道测量，每个颜色的校正必须分开进行。

## 设定光漂白阈限

为了确定特定环境条件下给予荧光标记生物分子的最佳激光功率，在开始正式测量前，有必要进行一系列功率测试。激光功率从小变大，直到超过阈限。对于每种能量设置，记录 FCS 曲线。然后进行数据分析，得到平均强度和焦点范围内分子的数量，以及每单粒子的计数率［即分子亮度（$\eta$）］。通过绘制激发强度和以上这些数据的图像，如图 12-4 所示，我们首先可以得知，分子亮度和激光功率在双对数尺度上线性同步增长。OPE 的起始斜率接近 1，而 TPE 的起始斜率应该接近 2。对于高激发功率，当接近饱和时曲线变得平整；当漂白作用显著时，曲线下滑。因此，明智的办法是测量亮度还在线性上升阶段的激光功率。安全边界主要取决于研究的系统。如果已知扩散时间会增加（如由于活体测量中黏结或局部黏性的改变），以上这些就必须被充分考虑到。在焦点域中光漂白会再增加更长的一段时间。

## 数据解释

FCS 曲线较易得到，但不能直接判读。由于现有拟合程序里不同元的数目是非常有限的，因此已有的生物系统相关知识能帮助我们避免错误解释数据。不管参数的值是否真正反映了样品的特性或物理意义，过多的自由参数都会得到极好的拟合结果。因此，我们有必要在开始正式测量之前，尽可能表现实验中放入物质的特点。因为扩散系数与流体动力学半径呈反比，而后者又反过来取决于球形分子质量的三次方根，质量增加到原来的 8 倍只会二等分扩散系数。在传统用于绘制 FCS 曲线的对数时间尺度中，这个效果几乎不能被观察到。因此，拟合过程中潜在成分的数目受到了的数学算法概率的限制，难以清晰分辨个体贡献。实际应用中，这说明三个扩散成分外加三重闪烁参数是能够被处理的上限。

**迁移率的研究**

因为扩散系数与溶液中球形颗粒的流体半径有关［公式（10）］，所以我们可以对粒

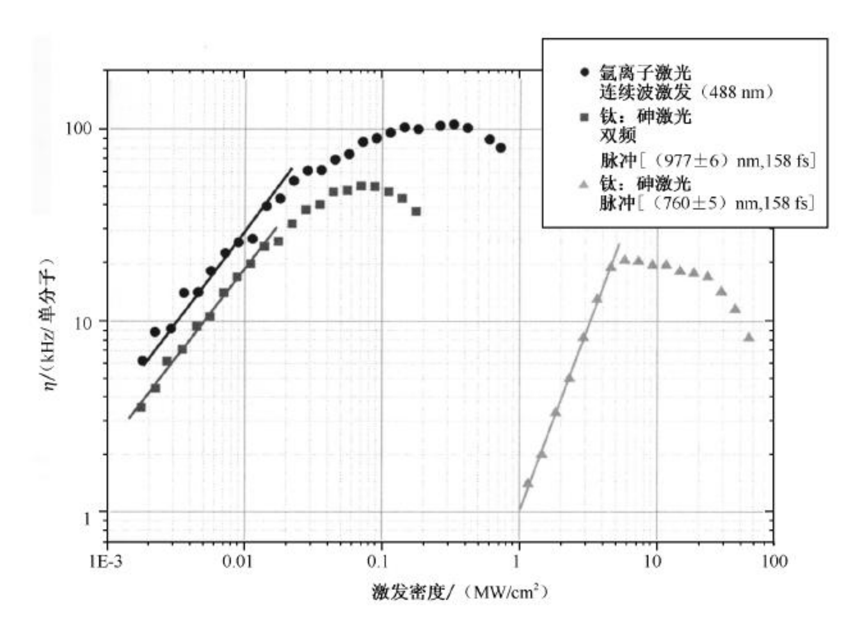



图 12-4 光漂白特征：对照每个单分子在水中从 Alexa488 的自相关测量中计算获得的率值。不同的激活模式有所不同：单光子连续波用氩离子激光（闭环）的 488 nm，单光子脉冲用双倍钛：砷在（977±6）nm 的频率，脉冲宽度 200 fs（$Gy^2$），TPE 在（760±5）nm（$Gy^3$）。对于 OPE（斜线 1，图左侧）亮度与激活功率呈线性相关，而 TPE（斜线 2，图右侧）则与强度的平方呈比例关系。对于连续波的 OPE，其饱和水平处在最高点。

子尺寸做出估计。假设标记效率为 100%，一个转移扩散参数和一个闪烁参数就可以描述曲线 [公式（15）]。当估计荧光粒子，如荧光颗粒或量子点的大小时，可应用同样的方法。但后者闪烁动力学可能会更加复杂

$$G(D,\tau)=\left[\frac{1}{\langle C\rangle\cdot V_{\text{eff}}}\cdot\frac{1}{1+\tau/\tau_D}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\tau/S^2\cdot\tau_D}}\right]\cdot\left[1+\frac{T}{1-T}\cdot e^{-\tau/\tau_{\text{triplet}}}\right] \quad (18)$$

如果样品中仍然有自由染料，就必须加入第二个扩散系数

$$G(D,\tau)=\frac{1}{\langle N\rangle}\cdot\left\{f\cdot\left[\frac{1}{1+\frac{\tau_1}{\tau_{D1}}}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau_1}{S^2\cdot\tau_{D1}}}}\right]+(1-f)\cdot\left[\frac{1}{1+\frac{\tau_2}{\tau_{D2}}}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau_2}{S^2\cdot\tau_{D2}}}}\right]\right\}\cdot\left[1+\frac{T}{1-T}\cdot e^{-\tau/\tau_{\text{triplet}}}\right] \quad (19)$$

这里我们假定三重闪烁是相同的。参数 $f$ 指明有扩散时间 $\tau_1$ 分子的比例，如自由染料分子的比例。如果两个扩散种类难以区分，则对溶液中自由染料进行一次单成分参考测量。因此，可以确定更短的扩散时间和潜在的三重相关参数，这些被认为是二元拟合中的系数。

**结合反应**

结合或分裂而导致分子形状或大小的任何变化都会影响粒子的流体力学半径，也反

映在扩散系数和观察范围平均扩散时间的变化上。在结合反应的研究中只有更小的配体才被标记，因此，至少要考虑两种，甚至三种不同的扩散种类（自由染料、标记配体、复合物）

$$G(D,\tau)=\frac{1}{\langle N\rangle}\cdot\left[1+\frac{T}{1-T}\cdot e^{-\tau/\tau_{\text{triplet}}}\right]\cdot\sum_{i=1}^{3}\left\{f_i\cdot\left[\frac{1}{1+\frac{\tau_i}{\tau_{Di}}}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau_{i1}}{S^2\cdot\tau_{Di}}}}\right]\right\}$$

$$\text{和}\sum_{i=1}^{3}f_i=1 \tag{20}$$

在这种复杂的系统中，对每个个体的拟合过程，一般推荐使用参考测量来最大限度地减少自由参数的个数：在缓冲液中的自由染料、不完整标记的配体和最终完整的系统。然而，最好是实现纯化蛋白质，而使自由染料成分变得不必要。

幸好 dcFCCS 简化了这种分析过程。如果两个不同标记的反应物有相当的尺寸，除非需要高精确性，否则它们至少在第一次估计中可能被作为同种自相关分析中的有效元处理。从自相关曲线的振幅中，只能确定总体浓度。一个对交叉相关的简单一元拟合产生交叉相关曲线的振幅，因此双标记粒子的浓度可以根据公式（6）来确定

$$\langle C_{ij}\rangle=\frac{G_x(0)}{G_i(0)\cdot G_j(0)\cdot V_{\text{eff}}}$$

只考虑交叉相关的振幅以及低自相关曲线 $j$（剩余多的那种），我们可以得到双标记分子的比例

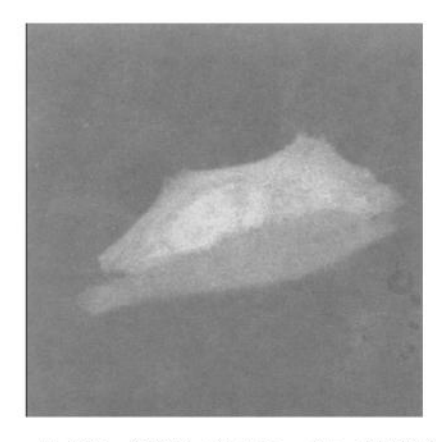
$$\langle C_{ij}\rangle\cdot V_{\text{eff}}=\langle N_{ij}\rangle\Rightarrow\frac{\langle N_{ij}\rangle}{\langle N_i\rangle}=\frac{G_x(0)}{G_j(0)} \tag{21}$$

这就是说，对于恒定的自相关振幅，交叉相关振幅的增加直接反映两种颜色携带微粒数量的增加。

## 在体测量

特别对于在体测量来说，LSM 和 FCS 的结合很有用。因为这不仅能对研究中的系统做出详细的三维图，而且能精确定位共焦范围。可惜的是，成像大多依赖于多光管，而比起 FCS 中使用的 APD，多光管对黄色及红色光谱不敏感。因此，能给出明亮图像的细胞通常表示荧光团浓度对敏感的 FCS 测量来说太高了（图 12-5）。然而，很多研究者认为在体细胞和组织的测量是最终目标。为了达到这个目标，我们要尽可能考虑到各种潜在的问题，并加以避免。

众多的对细胞极其重要的物质只能释放微弱的荧光。这些物质中有 NADH、FAD 以及诸如色氨酸的荧光氨基酸。在高浓度下集中这些物质，它们可以形成所谓的自荧光背景。这些背景在不同的细胞中是不同的，特别是在不同的细胞株中。选择一种低自荧光的细胞株或没有附加颜色物质的细胞培养媒介可以显著增加信噪比。对大多数细胞株来说，自荧光主要在黄绿光谱范围。因此橙红生色基团更容易从背景中被分离出来，从而被探测到。预漂白（即将整个细胞暴露在强辐射下，暴露时间长于测量时暴露时间）对细胞有极大危害，故不宜采用。然而，如果我们观察到强光漂白现象，我们可以在正式测量开始前等待荧光信号自发性衰减到平缓状态。这符合选择更多移动种类，这些种



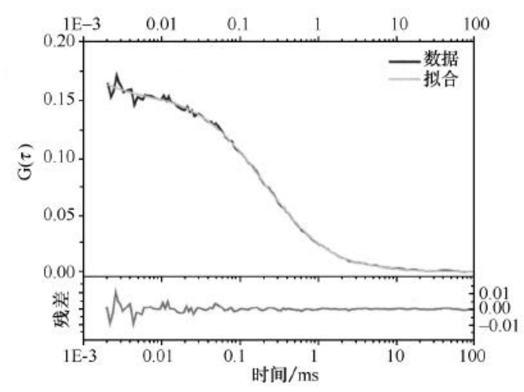



图 12-5　活细胞中的 FCS：（左）不同浓度下，488 nm 光激发的 GFP 表达细胞的 LSM 成像暗的那个更适合 FCS 测量。（右）记录细胞中 GFP 自由扩散的 TPE 自相关曲线，它与扩散元和闪烁因子匹配良好。扩散时间大约是 0.2 ms，结构参数约为 4。

类不会在穿越焦点范围时被漂白。或者，可以使用诸如扫描 FCS 或者总内反射荧光显微镜等技术（Lieto et al. 2003；Kis-Petikova and Gratton 2004）。

总体上，正确调整 FCS 装置来实现细胞内测量是有困难的，因为细胞和周围介质存在折射率的不同。甚至这些不同在不同的细胞中还不一样。由于细胞很薄，共焦范围的变形只能在一个很小的范围内进行。但这种变形在多层细胞或组织中很快恶化。因此细胞内测量与纯缓冲液测量无太大不同，自由三维扩散是最常见的模型。膜测量则基于两维扩散假设。然而，相关函数依赖于细胞内观察范围实际位置和所观察的生物系统，故其也有显著不同的形式。例如，局部限制的扩散范围与焦点范围元件的扩散范围相比（如测量小细胞器时），需要更复杂的模型（Gennerich and Schild，2000，2002）。

分析 FCS 曲线的一种流行方法是反常扩散模型，该模型假设衰减速度比预期慢。自由扩散粒子均方位移比正常扩散更慢，这是反常模型的参考基础。自由扩散粒子的均方位移与 $t^{\alpha}$ 成比例（$0<\alpha<1$），而不是 $t$。虽然这个模型能带来更好的拟合度，但是它的物理基础不强，而且得到参数的物理意义有待商榷。特别是，一个更简单的二元模型能否同样可以实现良好的拟合（与 E. Petrov 个人交流）。后者也被推荐用于强相关背景条件。这种背景可能会被当作是一种扩散类处理，从而被相应地打上标记，从实际数据处理中删除。然而，由于细胞都是个体，所以可以通过观察大量不同细胞在不同时间内参数的分布得到细胞内测量有意义的数据。

## 总结和结论

总之，FCS 是一种适合在体和离体测量的多功能技术。它是研究低浓度生化反应和实时监测反应动力学的有力工具。在大量商业装置广泛普及后，这一技术不再仅限于被一些有物理学基础且能够构建个人设备的用户使用（虽然定制转置对处理复杂的测定有更好的灵活性）。乍看之下，该程序更多包含数据处理过程，而非基于图像技术。但

抽提量化数据比较直接，而得到定性的是或否答案则更简单。

## 参考文献


Aragón S.R. and Pecora R. 1975. Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion. *Biopolymers* **14:** 119–138.

———. 1976. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **64:** 1791–1803.

Baird G.S., Zacharias D.A., and Tsien R.Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 11984–11989.

Berland K.M., So P.T.C., and Gratton E. 1995. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: Method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.* **68:** 694–701.

Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., and Tsien R.Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 7877–7882.

Chan W.C.W., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., and Nie S. 2002. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13:** 40–46.

Chattoraj M., King B.A., Bublitz G.U., and Boxer S.G. 1996. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 8362–8367.

Culbertson C.T., Jacobson S.C., and Ramsey J.M. 2002. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta* **56:** 365–373.

Denk W., Strickler J.H., and Webb W.W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248:** 73–76.

Donnert G., Eggeling C., and Hell S.W. 2007. Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation. *Nat. Methods* **4:** 81–86.

Ehrenberg M. and Rigler R. 1974. Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem. Phys.* **4:** 390–401.

Eigen M. and Rigler R. 1994. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 5740–5747.

Elson E.L. and Magde D. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13:** 1–27.

Elson E.L., Schlessinger J., Koppel D.E., Axelrod D., and Webb W.W. 1976. Measurement of lateral transport on cell surfaces. *Prog. Clin. Biol. Res.* **9:** 137–147.

Enderlein J., Gregor I., Patra D., Dertinger T., and Kaupp U.B. 2005. Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *Chem. Phys. Chem.* **6:** 2324–2336.

Fahey P.F., Barak L.S., Elson E.L., Koppel D.E., Wolf D.E., and Webb W.W. 1977. Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science* **195:** 305–306.

Gennerich A. and Schild D. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys. J.* **79:** 3294–3306.

———. 2002. Anisotropic diffusion in mitral cell dendrites revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **83:** 510–522.

Göppert-Mayer M. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Physik* **9:** 273–294.

Haupts U., Maiti S., Schwille P., and Webb W.W. 1998. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 13573–13578.

Heinze K.G., Jahnz M., and Schwille P. 2004. Triple-color coincidence analysis: One step further in following higher order molecular complex formation. *Biophys. J.* **86:** 506–516.

Heinze K.G., Koltermann A., and Schwille P. 2000. Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 10377–10382.

Heinze K.G., Rarbach M., Jahnz M., and Schwille P. 2002. Two-photon fluorescence coincidence analysis: Rapid measurements of enzyme kinetics. *Biophys. J.* **83:** 1671–1681.

Hess S.T. and Webb W.W. 2002. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **83:** 2300–2317.

Hohng S. and Ha T. 2004. Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **126:** 1324–1325.

Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., and Simon S.M. 2003. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* **21:** 47–51.

Jovin T.M. 2003. Quantum dots finally come of age. *Nat. Biotechnol.* **21:** 32–33.

Jung G. and Zumbusch A. 2006. Improving autofluorescent proteins: Comparative studies of the effective brightness of green fluorescent protein (GFP) mutants. *Microsc. Res. Tech.* **69:** 175–185.

Kaushalya S.K., Balaji J., Garai K., and Maiti S. 2005. Fluorescence correlation microscopy with real-time alignment readout. *Appl. Optics* **44:** 3262–3265.

Kettling U., Koltermann A., Schwille P., and Eigen M. 1998. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 1416–1420.

Kinjo M. and Rigler R. 1995. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **23:** 1795–1799.

Kis-Petikova K. and Gratton E. 2004. Distance measurement by circular scanning of the excitation beam in the two-photon microscope. *Microsc. Res. Tech.* **63:** 34–49.

Kojro Z., Riede A., Schubert M., and Grill W. 1999. Systematic and statistical errors in correlation estimators obtained from various digital correlators. *Rev. Sci. Instrum.* **70:** 4487–4496.

Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., and Webb W.W. 2003. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* **300:** 1434–1436.

Lieto A.M., Cush R.C., and Thompson N.L. 2003. Ligand-receptor kinetics measured by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **85:** 3294–3302.

Lin S.H., Fujimura Y., Neusser H.J., and Schlag E.W. 1984. *Multiphoton spectroscopy of molecules.* Academic Press, London.

Magatti D. and Ferri F. 2001. Fast multi-tau real-time software correlator for dynamic light scattering. *Appl. Optics* **40:** 4011–4021.

———. 2003. 25 ns software correlator for photon and fluorescence correlation spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **74:** 1135–1144.

Magde D., Elson E.L., and Webb W.W. 1972. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29:** 705–708.

———. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **13:** 29–61.

Magde D., Webb W.W., and Elson E.L. 1978. Fluorescence correlation spectroscopy. III. Uniform translation and laminar flow. *Biopolymers* **17:** 361–376.

Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., and Lukyanov S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17:** 969–973.

Miller A.E., Fischer A.J., Laurence T., Hollars C.W., Saykally R.J., Lagarias J.C., and Huser T. 2006. Single-molecule dynamics

of phytochrome-bound fluorophores probed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 11136–11141.

Miyawaki A., Sawano A., and Kogure T. 2003. Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores. *Nature* **5:** S1–S7.

PerkinElmer 2003. Photon Counting Overview, www.optoelectronics.perkinelmer.com. PerkinElmer, Fremont, California.

Rauer B., Neumann E., Widengren J., and Rigler R. 1996. Fluorescence correlation spectrometry of the interaction kinetics of tetramethylrhodamine alpha-bungarotoxin with torpedo californica acetylcholine receptor. *Biophys. Chem.* **58:** 3–12.

Reichman J. 1998. *Chroma—Handbook of optical filters.* Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont.

Rigler R. and Widengren J. 1990. Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *BioScience* **3:** 180–183.

Rigler R., Mets U., Widengren J., and Kask P. 1993. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.* **22:** 169–175.

Schatzel K. 1987. Correlation techniques in dynamic light scattering. *Appl. Phys. B* **42:** 193–213.

Schatzel K., Drewel M., and Stimac S. 1988. Photon correlation measurements at large lag times: Improving statistical accuracy. *J. Mod. Optics* **35:** 711–718.

Schwille P., Bieschke J., and Oehlenschläger F. 1997a. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys. Chem.* **66:** 211–228.

Schwille P., Meyer-Almes F.J., and Rigler R. 1997b. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* **72:** 1878–1886.

Schwille P., Haupts U., Maiti S., and Webb W.W. 1999. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.* **77:** 2251–2265.

Schwille P., Kummer S., Heikal A.A., Moerner W.E., and Webb W.W. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 151–156.

Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., and Tsien R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22:** 1567–1572.

Shimomura O., Johnson F.H., and Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59:** 223–240.

Smoluchowski M. 1906. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Ann. Physik* **21:** 756–780.

Weidemann T., Wachsmuth M., Tewes M., Rippe K., and Langowski J. 2002. Analysis of ligand binding by two-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Single Mol.* **3:** 49–61.

Weisshart K., Jungel V., and Briddon S.J. 2004. The LSM 510 META-ConfoCor 2 system: An integrated imaging and spectroscopic platform for single-molecule detection. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5:** 135–154.

Widengren J., Mets U., and Rigler R. 1995. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.* **99:** 13368–13379.

Wiedenmann J., Schenk A., Rocker C., Girod A., Spindler K.D., and Nienhaus G.U. 2002. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 11646–11651.

Winkler T., Kettling U., Koltermann A., and Eigen M. 1999. Confocal fluorescence coincidence analysis: An approach to ultra high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 1375–1378.

（叶　伟　李彬寅　译）

# 第 13 章　采用光阱技术研究分子马达的性质

**James A. Spudich**[*]　**Sarah E. Rice**[†]　**Ronald S. Rock**[‡]
**Thomas J. Purcell**[§]　**Hans M. Warrick**[*]

[*] Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; [†] Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University, Chicago, Illinois 60611; [‡] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, Illinois 6037; [§] Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, California 94158

## 摘要

体外运动分析技术（*in vitro* motility assays）使我们能够了解诸如肌球蛋白沿肌动蛋白丝的运动、驱动蛋白沿微管的运动与 ATP 水解的关系。而单分子激光光阱技术能进一步获取有关诸如驱动蛋白、肌球蛋白或行进性 DNA 酶（processive DNA enzyme）运动的详细信息。体外运动分析技术和光阱技术的联合可以揭示这些分子伴随着 ATP 的水解循环所发生的动态结构变化。本章介绍了光阱技术在进行性和非进行性分子马达蛋白研究中的应用，重点介绍仪器设计和描述分子运动的方法。

## 概述

体外肌球蛋白-肌动蛋白运动分析技术（Sheetz and Spudich 1983; Spudich et al. 1985; Kron and Spudich 1986）和体外驱动蛋白-微管蛋白运动分析技术（Vale et al. 1985; Gelles et al. 1988）揭示了 ATP 水解和这些分子马达机械运动的关系。这项技术可以直接测量蛋白质沿轨迹运动的速度和由它们的结构决定的运动方向。人们利用这项技术初步测量了肌球蛋白 II 的步长，并发现其次级片段 1 为肌球蛋白 II 的马达结构域（Toyoshima et al. 1987）。更重要的是，这项技术首次在单分子水平观察到驱动蛋白沿微管蛋白的运动（Howard et al. 1989），以及肌球蛋白沿肌动蛋白的运动（Uyeda et al. 1991）。

以体外运动分析技术为基础衍生出的单分子光阱技术（Svoboda et al. 1993; Finer et al. 1994; Visscher et al. 1999）（图 13-1，左）可以获得更加精密的信息，如分子马达的步长、ATP 酶动力学、阻力以及“装载”对分子马达的生化性质和机械行为的影响。这个强大的工具已经被应用于驱动蛋白（Svoboda et al. 1993; Visscher et al. 1999）、肌球蛋白（Finer et al. 1994; Mehta et al. 1999c; Rief et al. 2000; Rock et al. 2001）和进行性 DNA 酶（Wang et al. 1998; Mehta and Spudich 1998）的研究中。以上研究定义了这些分子马达的机械模型，并让我们更好地了解了其工作原理。

尤为强大的是，体外运动分析技术和光阱技术的结合，使我们可以揭示这些分子马达伴随着 ATP 的水解循环发生的精密的动态结构变化。一个典型的例子是最近关于肌球蛋白 VI 的研究。肌球蛋白 VI 是一种特殊的肌球蛋白，它的步长达到 36 nm，但其轻

链结合域却很短，这个结构域在其他肌球蛋白中是作为“杠杆臂”来扩大机械运动步长的，这个明显的矛盾给“杠杆臂”假说（Yanagida and Iwane，2000）带来了严重的挑战。通过将肌球蛋白 VI 的步长和其 4 个不同构造的运动速度和方向与已知的后摆（poststroke）结构进行比对，揭示了肌球蛋白 VI 前摆（prestroke）结构的基本特征（图 13-1，右，见图版）（Bryant et al. 2007）。这一结果实际上验证了“杠杆臂”假说，只不过对于肌球蛋白 VI 来说，它的杠杆臂可以摆动约 180°，以致摆动距离达到 20 nm，剩下的 16 nm 距离来自于其头部在寻找合适的肌动蛋白结合位点时发生的自由扩散。以上研究表明体外运动分析技术和光阱技术的联合是揭示蛋白质细微结构变化的强大工具，也巩固了肌球蛋白家族通用的“杠杆臂”假说。

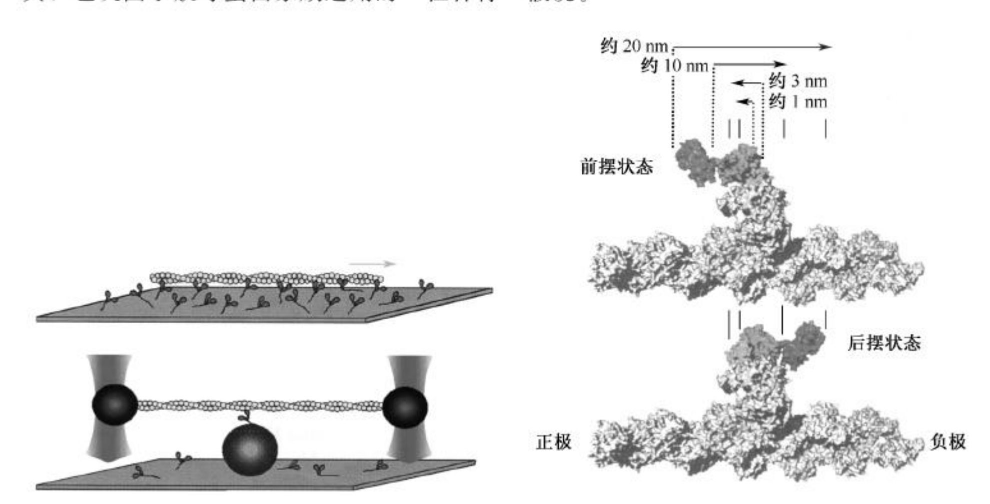



图 13-1 体外实验和肌球蛋白 VI 图示。（左图）体外运动分析技术（Kron and Spudich 1986）（上图）和单分子激光光阱技术（Finer et al. 1994）（下图）。两种技术中，肌球蛋白均被附着在盖玻片上，荧光标记的肌动蛋白纤维在肌球蛋白上移动。对于激光光阱技术，盖玻片上黏合有一层 1 μm 直径的玻璃珠，用来将肌动蛋白分子抬高，使其能够与被激光光阱抬高的肌球蛋白相互作用，激光光阱是通过 1 μm 直径的聚苯乙烯珠子结合在肌动蛋白纤维的两侧。（右图）体外运动分析技术和激光光阱技术获得的前摆状态的肌动蛋白 VI（Bryant et al. 2007）和已知的后摆状态的肌动蛋白 VI（Menetry et al. 2005）。分子马达的负极方向可以通过独特的插入和其结合的钙调蛋白（橙色和紫色区域）获得。杠杆臂上的钙调蛋白在肌动蛋白 II 和 V 中均不存在。从前摆状态到后摆状态，杠杆臂的 C 端（蓝色）向肌动蛋白纤维的负极方向移动，而转换区（绿色）同肌动蛋白 II 和 V 一样向正极方向移动。

对于大多数实验室来说，应用激光光阱技术的最大障碍是高昂的设备建设、维护和使用费用。不过目前已经出现了商品化的敏感性极强的激光光阱部件，价格也呈下降趋势。光阱技术的不断改进使得这项技术逐渐普及，甚至最终会成为研究生物系统运动和生物力学的常规“显微镜”。在这里，我们介绍了如何利用光阱技术研究行进性和非行进性分子马达蛋白，重点介绍了仪器设计和分子运动的描述方法。读者可以自行阅读光阱在其他领域的应用（Ashkin 1998；Mehta and Spudich 1998；Berns et al. 1992；Franklin et al. 1994；Svoboda and Block 1994；Simmons et al. 1996；Smith et al. 1996；

Visscher et al. 1996; Mehta et al. 1997, 1998a, 1998b; Gittes and Schmidt 1998; Molloy 1998; Sheetz 1998; Sterba and Sheetz 1998; Visscher and Block 1998; Neuman et al. 1999, 2005; Rock et al. 2000; Schnitzer et al. 2000; Steffen et al. 2001; Rice et al. 2003; Neuman and Block 2004; Berg-Sorensen et al. 2006)。本章最后附有 GFP 抗体与微颗粒结合的实验步骤和“哑铃分析”的实验步骤。

## 光阱仪器

### 光阱的基本设计

光阱包括一个通过短焦距镜片（通常是一个高数值孔径的物镜）高度聚焦的激光。简单来说，进入物体的激光发生折射，且由于光的动量，对物体产生作用力。对于球型物体（如珠子）来说，激光将物体的中心拉入它的焦距。这个力类似于全方向的线性弹力。弹性系数被定义为光阱刚度系数。应用于分子马达的光阱，刚度系数一般为0.02～0.06 pN/nm，也有更强（达 1 pN/nm）的光阱被使用（Smith et al. 1996）。细胞骨架分子马达的移动产生相对弱的力，约 5 pN，步长 5～40 nm。因此测量分子马达移动的光阱可以检测到纳米级的运动，并达到毫秒级的时间分辨率。

光阱设计见图 13-2。在我们最初设计的双光束光阱（图 13-1，左）中，声光偏转器（AOD）反馈光阱的位置，而镜转换和光路用于引导光阱（Finer et al. 1994）。现在，我们用一套商品化的双直角声光偏转器来产生多个光阱，并且可以快速地在样品平面上调整位置（Finer et al. 1994; Visscher et al. 1996; Molloy 1998）。通过改变 AOD 的输入信号，光阱的许多功能，如定位、光阱刚性调整、多光阱设计、力钳制和位置钳制等，都能实现快速简单的控制。

### 光阱设计细节

Nd: YAG, Nd: $YVO_4$（均为 1064 nm）或 Nd: YLF（1047 nm）光阱激光器最为常用，因为它们的波长约 1 μm，可以最大限度地避免对生物样品的光损伤（Berns et al. 1992; Svoboda and Block 1994; Neuman et al. 1999）。这种二极管泵浦固体激光器有很好的定位稳定性（纳米级精确定位）和高输出能量（1～10 W）。Coherent Compass 1064-2000 CW 激光器为空气制冷，输出功率 2 W，光束直径 1 mm。

为确保光束的稳定性，光阱激光器必须始终在它的激光阈值之外运转良好。高输出功率可能会损害某些光学器件。图 13-2 的设计使用了一个偏振分光器来分离一部分到废束箱（beam dump）。输入光的极性通过旋转一个 λ/2 波片来控制。一个 3 倍光束放大器（Newport T81-3X）置于偏振分光器之后，AOD 之前，将 1 mm 直径的光束放大到 3 mm，接近 AOD 的孔径（4 mm），这使得样品平面上的光阱有最大的移动范围。光束被 AOD 偏转后必须放大以填满物镜（L3，图 13-2）的后孔。通过 L1 的被 AOD 偏转的光束被再次放大，放大系数为 F3/F2。如果被 AOD（F2/F1）偏转后光束的放大被最小化，则光束在样品平面上被 AOD 偏转的范围就会最大化。然而这会导致光阱的位置的波动，因为样品台上的噪声会被放大到允许值之外。在实际使用时，在噪声允许值的范围内，可以实现样品台上光阱的移动范围最大化。

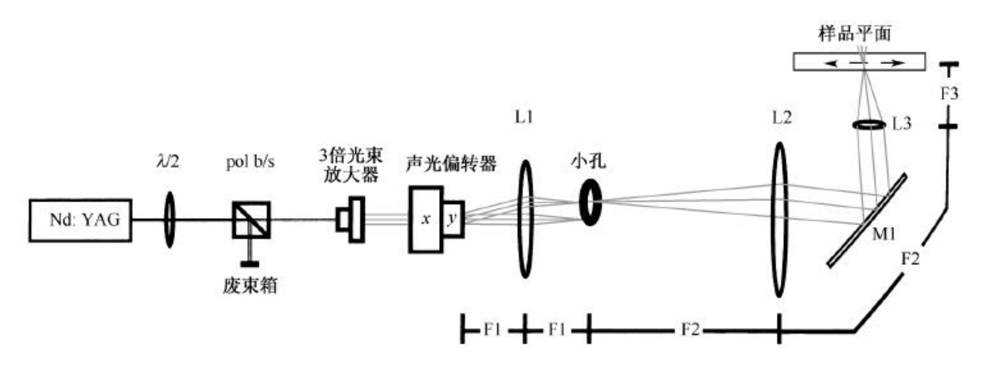



图 13-2　光阱设计。为了绘制激光光路，图中假设镜片为薄镜片。左侧为 Nd：YAG 光阱激光（Coherent Compass 1064-2000），发射的激光用黑线表示。大部分能量由 λ/2 波片和偏振分光器（pol b/s）分离到废束箱。3 倍放大后，光束被直角声光偏转器偏转。图中只显示了原光束和一条偏转光束，实际上有 4 条主要光束从双声光偏转器中射出。偏转光束被一个 L1 镜片焦距大小的小孔选择。L1 和 L2 镜片的作用是第二个 3 倍放大器，用于填满 L3 物镜的后孔。光束到达物镜前被一个二色性镜 M1 反射，这个反射镜的目的是调整样品平面上光阱的位置和倾斜度。图 13-1 左中的双光束光阱有两个独立的光路，此图中只显示了一个，每一个光阱光束被各自的一套直角声光偏转器独立控制。

在 AOD 里，一个晶状材料连接到一个压电传感器上，用于将高频率的振荡电压（MHz）转换成声波，通过晶状材料传播，使之与应用的电压有同样的频率。由于穿过了晶状材料，它可以产生和传感器同步压缩和放大的波形，导致依据晶体折射率的周期性变化。这改变了入射光的相位。出射光的偏转由相位光栅的衍射导致。声波、光栅的周期性以及折射角度，都根据应用电压频率的改变而改变。由光栅产生的衍射模式的强度分布依赖于晶体上激光的入射角度。AOD 的位置设为：使通过光栅的一阶偏转有最大光强，而高阶偏转具有足够大的角度，能被小孔阻挡（解释见后文）。实际应用时，每一个采用上述设计的 AOD（IntraAction Corp.）在一阶偏转时偏转最大约 75%的入射光。一些光没有发生偏转，一小部分在更高阶被偏转。因此，4 个零阶和一阶光束从一组双直角（$x$ 和 $y$）声光偏转器中出射：未偏转光、$x$ 偏转光、$y$ 偏转光、在 $x$ 和 $y$ 中均发生偏转的光（最大占总入射光的 55%），后者即为光阱光束。AOD 的电脑控制见下文。

在 AOD 之后，两个镜片将光束放大 3 倍到 9 mm 直径，稍大于物镜后孔的 7 mm 直径。如果低于物镜后孔直径，入射光就不会充分聚焦。这会导致全方向光阱刚度偏低，特别是在激光束传播的方向。第一个镜片（L1，图 13-2）焦距为 50 mm，在焦点上的小孔选择性地透过在 $x$ 和 $y$ 中均发生偏转的光。在一个方向的最大折射角度是约 50 mrad，范围是25 mrad。这可转换成，在 L1 焦平面，4 个零阶和一阶偏转光束中心之间 2.5 mm 的横断距离。这将会在 $x$ 或 $y$ 中产生位置相差至少 1.25 mm 的 4 个焦点。L1 焦点平面上的位于 $x$ 和 $y$ 平均形成位置上的小孔可以调节全方向上的一阶 AOD 偏转的最大范围，同时可以消除未偏转光、$x$ 或 $y$ 单偏转光以及更高阶偏转光。第二个镜片 L2 位于小孔后 150 mm（L2 的焦距），光束被 L2 校对，之后被反射到样品平面，从 L2 到达反射面的距离也为 150 mm。如果 L2 和物镜焦平面的分离被维持，则物镜总是

回填的，即使是光束在 L2 平面被 AOD 偏转。二色镜 M1 将波长大于 1000 nm 的光束反射到样品平面。

用于光阱的显微镜物镜一般为高 NA (≥1.2，常用 1.4)，从而可以有效地聚焦光阱激光。穿过珠子时光阱的强度梯度决定了光阱的刚性 (Ashkin 1998)。

## 在纳米和毫秒级分辨率下记录珠子的位置

记录光阱珠子位置的成像系统必须达到纳米和毫秒级的分辨率。四象限光电探测器 (QPD) 因其可以高度敏感的探测二维平面上的运动而被采用。在图 13-3 介绍的方法中，光阱珠子或珠子通过 QPD (Hamamatsu, Inc.) 成像。另外，还可在聚光器的后焦平面上用非成像的方法通过 QPD 检测珠子位置 (Svoboda et al. 1993; Visscher et al. 1996)。这里介绍的系统使用一个多模光纤耦合半导体激光器 (800 nm, Cw, 0.5 W, LaserDiode, Inc.)，在激光阈值下运行，用于样本的明场照明。高亮度发光二极管 (LED) 是另一种较廉价的选择。被珠子折射的光束从 QPD 偏转，在 QPD 上留下一个黑影，可以反映珠子的位置。为了达到珠子位置的最高分辨率，这个黑影的直径应该为 QPD 的大小 (本文介绍的设计为 1 mm)。L4 镜片的焦距很长 (750 mm)，用于将物镜的影像放大 600 倍在 QPD 上显示。在此设计中，QPD 可以检测到中心 1 mm 直径图像的 1 μm 的位置改变，这转化成对珠子移动的纳米级的敏感性。对二维平面上移动的检测是通过比较 4 个不同的光电二极管对入射光的电压反应而实现的。QPD 输出将左侧两象限和右侧两象限的电压差 ([1+3]−[2+4]) / (1+2+3+4) 以及上面两象限和下面两象限的电压差 ([1+2]−[3+4]) / (1+2+3+4) 进行比较。当珠子从 QPD 的中心向右移动时，QPD 输出的左-右信号 ([1+3]−[2+4]) / (1+2+3+4) 线性降低。当珠子离开探测器和左-右信号开始增大时，QPD 电压又回复到零。在实际应用时，

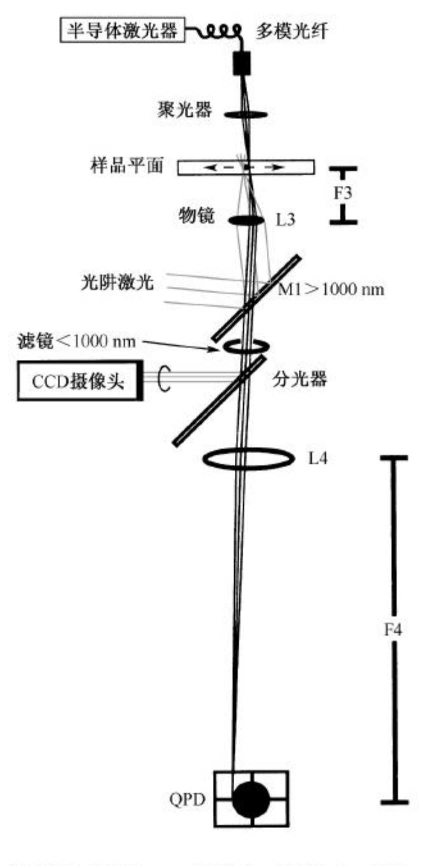



图 13-3 通过 QPD 跟踪珠子的运动，图中显示了 1 μm 珠子在 QPD 探测器上成像的过程。图中将镜片简化为薄镜片。800 nm 的半导体激光器 (Laser Diode, Inc. LCW-200F, 500 mV 输出) 与一个多模光纤耦合，在激光阈值下运行，作为高亮度光源，通过聚光器。珠子的图像通过物镜和二色镜 M1。一个小于 1000 nm 的滤镜阻断所有从样本的水-玻璃平面反射出来的光阱激光。一个分光器将一小部分入射光转移到 CCD 作为明场成像。L4 将珠子的图像放大投射到位于 L4 焦距位置的 QPD 上，从而实现纳米级别的探测精度。对于图 13-1 的双光束光阱，两个珠子通过各自的 QPD 分别成像。(此图获准依 Rice 等 2003 [© Elsevier] 再版)

QPD 的有效范围可以通过将 QPD 的反应三次方或更高阶的奇数次项来扩展。

QPD 的电压输出被电脑记录，用于分析。高速数据采集（DAQ）卡能够在高时间分辨率下（10 次/kHz）记录珠子的位置。记录的数据可以能过 LabView（National Instrument）、Matlab（MathWork）或 Igor（WaveMetric）等软件包来分析处理。

有研究表明无意信号过滤可能在系统中发生（Berg-Sorensen et al. 2003）。Flyvbjerg 和他的同事（Berg-Sorensen et al. 2003，2006；Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004）介绍了避免此问题的方法，而且最新的方位探测器也解决了此干扰（Neuman and Block 2004）。

我们希望在使用光阱时可以同时观察明场和荧光图像，然而许多光阱中使用的纤维如肌动蛋白、DNA 等都不易在光镜下观察。二色镜的合适选择和组件的替换可以实现荧光、明场、二者的 CCD 成像以及 QPD 的同时使用（Mehta et al. 1998a）。

显微镜平台 $x$、$y$ 和 $z$ 轴的粗调（通常使用控制杆驱动的毫米级微操控制 $x$ 轴和 $y$ 轴）用于定位光阱中样品的位置。如果需要纳米级的精确定位，可以使用三轴压电平台。它的力反馈原理可以有效地降低平台的漂移，使系统组件的定位达到纳米级的精确度（Steffen et al. 2001）。

## 光阱的校正

激光的校对是通过在激光和可见光之间的光路上放置一个针孔光圈来实现的。可见光的后反射打到光圈上，镜片转换光路的 $x$ 和 $y$ 轴，直到后反射在光圈开口的周围形成一个光环。为了使可见光光路完全垂直居中于激光光路，通过调整光路与台面垂直，激光从镜片前面的第二个反射被带到光圈的中心。

为了保证光阱位于视野的中心，进入物镜后瞳孔的光阱光应该平行于物镜的可见光轴。方法是移开物镜，将一个反射镜平放在物镜架的肩部，光阱光就会通过上游的反射镜回射。

样品平面上光阱的粗校对可以在没有红外观察器的情况下操作，方法是使用一个 CCD 摄像头检测从样品玻璃-水界面反射的激光图像。图 13-4 介绍了用于明场观察的高分辨率 Sony Iris CCD 摄像头的安装。在图 13-3 中，一个小于 1000 nm 的拦截滤片会阻止光阱激光的少量光在 CCD 摄像头和 QPD 上的成像（Mehta et al. 1998a）。在这种情况下，为了校对需要，拦截滤片会被移除，并且明场光源会被阻断。摄像头就可以检测到回射的少量的光阱激光。当物镜的焦点在盖玻片平面附近时，光阱的回射图像是在聚焦的。当物镜上下移动时，图像就会在聚焦和不聚焦之间变换。当光阱正好正交于物镜的后焦面时，不聚焦的图像就会处于光阱的焦点。如果光阱没有校对，图像就会偏离光阱的焦点一定的角度。光束的校对可通过系统调整任何一对光路（如 3 倍放大镜片 L1 和 L2）或按照如上的“walk-in”方法（Sheetz 1998）来实现。另一种选择是使用一张有极高密度珠子的玻片（Sheetz 1998）。光阱会将光阱附近的珠子拉入内，而将光阱外的珠子推开。于是当光阱垂直于样品平面时，珠子就会形成波纹的样式；当光阱倾斜时，珠子就会被推向一侧。调校的方法同上。调校之后光阱的刚度和 AOD 必须重新计算，因为调校会影响光路。

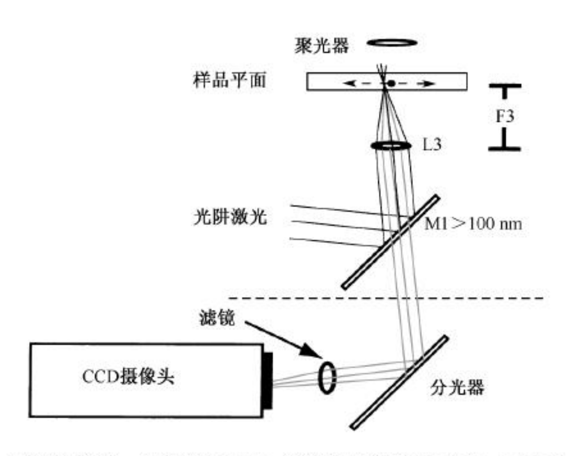



图 13-4　光阱的校对。图为使用 CCD 摄像头检测样品玻璃-水界面回射的图像来校对样品平面的光阱。由于二色镜的拦截波长是 1000 nm，少量的光阱光（1064）会穿过滤镜，在高分辨率 CCD 摄像头上成像。（此图获准依 Rice 等 2003 [Elsevier] 再版）

## AOD、QPD 和光阱刚度的校准

AOD 输入频率决定的珠子偏转、QPD 上珠子的放大和光阱刚度在使用前必须经过计算，分子马达的步长也可以在光阱中测量。校准可分为以下 4 步。

1. 使用一个校准玻片（5 μm 或 10 μm 标度）计算珠子通过 CCD 摄像头在显示屏上的放大倍数。
2. 通过比较 AOD 输入信号和显示屏上的偏转距离，定量 AOD 对光束偏转的等级。
3. 通过将光束偏转一个已知的距离并测量 QPD 的反应，测量珠子在 QPD 上的放大倍数。
4. 多种方法可以用于计算光阱刚度（Visscher et al. 1996; Gittes and Schmidt 1998; Visscher and Block 1998），在此讨论两种方法。这两种方法是互补的，因为它们基于的假说和依赖的系统参数是不同的。第一种方法测量一段较长时间内被光阱捕获的珠子的位置变化方差，而第二种方法测量一个较宽的频率范围内珠子布朗运动的能量谱。

根据均分定理，在一个足够长的时间段内光阱中珠子的一维的位置变化方差为 $k_b T/\kappa$，$\kappa$ 为光阱刚度。假设光阱为一个全方向的线性弹簧，则该方差只依赖于样品的温度。这在不考虑珠子和盖玻片表面距离的情况下，对于珠子在 $x$ 和 $y$ 轴上的运动是成立的。然而，珠子位置变化的方差是它的运动的标准差的平方。因此，系统中的一个小小的漂移、噪声或定位不稳都会导致光阱位置方差的显著增加，进而导致光阱刚度被低估。此外，如果 QPD 发生低通滤波，会使记录轨迹比真实轨迹平稳（Berg-Sorensen et al. 2003），从而减少珠子位置变化的方差。因此，这种方差的方法易导致未知指标和大小的系统错误。

能量谱法可以通过诊断和回避系统错误而避免这一问题（Berg-Sorensen and Fly-

vbjerg 2004)。在数学术语中，方差是能量谱的积分。然而方差只是一个数字，并没有内部校验。此外，能量谱作为整体波谱，可以和系统预期的布朗运动的波谱进行比较。这种计算方法依赖于长时间段内被捕获珠子的运动受光阱回复力控制的假设。其中回复力为一个线性弹力，运动用一个单一的特征频率描述。短时间内珠子的运动是自由扩散，依赖于珠子的阻力系数而不是光阱刚度。它是由无穷多个频率构成的。一组珠子能量谱可用于计算 $f_c$，此时光阱主导的运动（低频率）和自由扩散主导的运动（高频率）之间发生转换。Gittes 和 Schmidt（1998）、Svoboda 和 Block（1994）、Flyvbjerg 和 colleagues（Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004；Berg-Sorensen et al. 2006；Tolic-Norrelykke et al. 2006）详细介绍了能量谱的计算。MatLab 软件可以捕获珠子的实际能量谱并与理论能量谱相匹配（Hansen et al. 2006），它还进行数据的"健康测试"和以图表的方式显示结果。

珠子的拐角频率（$f_c$）同时依赖于光阱刚度和珠子的阻力系数。能量谱可以现实和珠子移动无关的特定频率的噪声源（如 60 Hz），低频噪声来自漂移，高频能量损失来自于低通滤波（Berg-Sorensen et al. 2003；Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004）。通过珠子位置变化的方差来计算光阱刚度时，以上这些布朗运动的波谱干扰都被忽略了。不过能量谱法的问题在于它依赖于珠子的阻力系数，因此也就依赖于珠子和盖玻片之间的距离，除非珠子处于本体溶液中（Schaffer et al. 2007）。当然，利用压电 $xy$ 平台和标刻 AOD，阻力系数和珠子-盖玻片距离都是很容易测量的（Tolic-Norrelykke et al. 2006）。

## 数字频率合成器和多重光阱设计

AOD 的光阱定位必须非常快速（≥10 kHz）和准确（≤1 nm），以满足光阱定位反馈控制和调节 AOD 输入频率构建多重光阱的需要（Molloy 1998）。为了达到纳米级的精确定位，数字频率合成器被用于驱动 AOD。它们可产生 30～80 MHz 的射频（RF）信号来驱动 AOD 上的压电传感器。由于数字输入可以稳定地合成同样的数字信号，因此可以得到稳定和极其准确的光阱定位结果。数码分辨率会限制 AOD 的挠度水平。对于一个 13 bit 的数字频率合成器，比特噪声导致光阱位置 0.012%（$1/2^{13}$）的误差，对应 10 μm 偏转范围的 AOD 则会产生 1.2 nm 的位置误差；24 bit 和 32 bit 数字频率合成器可将误差降低到 1 nm 以下。相反，模拟频率合成器在将模拟输入转换为 RF 信号时，会产生±0.25%的误差，这对 10 μm 范围 AOD 来说意味着 25 nm 的位置误差，这对绝大多数分子马达分析是不可接受的。当然如果光阱的移动范围下降，位置误差会相应地减少。

最新的数字频率合成器可以产生达 100 kHz 甚至更高频率的信号。这对多重光阱和光阱定位反馈控制是十分重要的。在实际应用时，QPD 的扫描频率必须在数量级上快于珠子的 $f_c$（100～1000 Hz）以满足多重光阱工作时光束迅速在两个位置之间切换的需要（Visscher et al. 1996；Molloy 1998；Visscher and Block 1998）。通常情况下需要扫描频率达到 10 kHz 以实现每 100 μs 对光阱位置的调整。在提高信号频率时必须小心。例如，调整 17～33 MHz RF 信号以驱动一个 10 kHz 的二氧化碲 AOD（IntraAction Corp.）会在该信号上诱导一个 10 Hz 的载波频率。用这种方法驱动的 AOD 偏转激光如同一个衍射光栅从 MHz 输入信号和 10 kHz 调整的卷积（Molloy 1998）。结果有

3个不同的光阱：原始的一阶偏转光束和两个偏离原始光束的对应10 kHz载波频率的光束（此设计中约6 nm）。在10 kHz下这一影响并不严重，因为3个光束之间的距离跟珠子的尺寸相比很小。然而在更高的频率下，这种“幽灵”光阱可能在样品平面上产生（Molloy 1998）。为了决定光阱在哪个范围内是一个线性弹力，我们可以在不同的驱动频率和不同珠子大小下获得能量谱。多光阱系统可以避免单光阱需要在两个位置之间反复转换的问题。创建多光阱系统有两种选择。第一，由两个数字频率合成器产生两个独立的RF输入，可以在放大前汇合，用于驱动单个AOD上的压电传感器，产生两个可独立控制的一阶光束偏转，可用于双光束光阱实验。第二，AOD产生的零阶非偏转光束可当作一个固定陷阱，通过偏转到 $x$ 和 $y$ 轴的光束进行反馈。下面介绍的光束光阱实验和这一类系统是兼容的。不过为了获得高分辨率的步长信息，它们仍是在可动光阱上使用力回馈。

## 在恒载条件下，用力钳检测下分子马达的运动速度和步长

力钳常用于光阱中，它通过使珠子中心和光阱之间的距离保持恒定，在被捕获的珠子上维持一个相对恒定的力。它可以在不依赖于刚度的情况下准确地测量步长。它是分子马达研究中的一个强有力的工具，可以十分准确地检测恒加载下分子马达速度和步长。力学探钳可以被用于ATPase的动力学研究以及分子马达的步速研究，而且比之前的实验手段更为精确（Visscher and Block 1998；Visscher et al. 1999；Rief et al. 2000；Schnitzer et al. 2000；Veigel et al. 2002；Mehta 2001）。

定位钳（position clamping）是将珠子的位置尽量维持不变以获得等长条件（isometric condition）（Finer et al. 1994；Simmons et al. 1996）。定位钳可以检测短距离的等长力，如非行进中马达只迈一步就离开纤维丝。实际上，定位钳产生一个刚性光阱（stiffer trap）而不是一个等长光阱。非连续马达的力学检测仍然很难，这是因为光阱并不是完全等长的，而且还因为系统联系中的柔性（Mehta and Spudich 1998）。

不管是力钳还是定位钳，计算机程序的反应时间必须非常快，从而能够在毫秒级别更新光阱的位置。在专用数字信号处理器上的一个编译的低等级软件程序被用于根据珠子的位置反馈调整光阱的位置。一个力钳程序必须从光阱刚度和QPD对珠子偏转的电压反应的校准开始。比例-积分-微分法（PID）被用于计算珠子位置调整值，从而在马达沿纤维丝移动时维持力的恒定。PID控制器的使用方法见Carnegie Mellon University和University of Michigan网站（http://www.engin.umich.edu/group/ctm/PID/PID.htm），参考文献见Franklin等（1994）。

为了最大化QPD的工作范围，反馈系统维持珠子的位置，在QPD的一端成像。马达做挣脱光阱的移动，直到从珠子中心到光阱的距离乘以光阱刚度等于需要的载入。接下来，反馈维持珠子和光阱之间的距离从而保持力的恒定。马达在恒载入下移动直到它到达QPD工作范围的另一端，在这里介绍的系统中大约300 nm。当珠子开始离开QPD的线性范围时，光阱停止移动，力随着马达的移动逐渐增大，最终马达被拉回到中心。上述技术的使用依赖于所研究的马达的性质。下一部分将介绍不同类型马达的光阱实验，着重介绍肌球蛋白。

## 行进性和非行进性马达光阱的可测参数

光阱实验已经被应用于行进和非行进分子马达。行进中马达进行多重催化循环，并通过每次和纤维丝的扩散相遇不断移动。非行进性马达结合纤维丝后，通常只进行一个催化循环并前进一步，之后离开纤维丝。行进性和非行进性马达可以采用不同的实验几何，从而获得不同的信息。两种马达的驻留时间（分子马达每一步和纤维丝结合的平均时间）都可以被准确测量。对于非行进性马达，马达分子在结合纤维丝后会突然掉落，这时可以观察到珠子位置的变动，这会导致弹簧刚度的突然提高（Molloy et al. 1995）。在特定情况下，非行进性马达的驻留时间可以通过使用相关热扩散来测量（Mehta et al. 1997）。

为了测量行进性马达的步长，系统中的柔度（珠子、马达、纤维之间的连接，还有分子马达内的柔度）必须在一个固定光阱中被测量和校准（Svoboda et al. 1993；Svoboda and Block 1994）。摆动珠子的技术已被用于在不依赖于系统柔度的情况下测量步长（Mehta et al. 1999c；Veigel et al. 2002）。测量步长最准确的方法是使用光学力钳 Visscher et al. 1999；Rief et al. 2000；Rock et al. 2001），误差小于 1 nm。一些行进性马达在光学力钳里广泛的步长分布［如肌球蛋白 VI（Rock et al. 2001)］反映了这些马达步长的范围。对于非行进性马达，只能观察到单一的结合事件和相应的单一催化循环。由于布朗运动，在结合之前珠子的位置并不能很好地确定。这会导致步长数值的广泛分布（Molloy et al. 1995）。

行进性马达在固定光阱的中心之外仍可以移动几步。这会导致光阱和珠子的分离，并因此导致载入的提高，直到它们停住。所以，这些马达的阻力可以被测量。除非光阱绝对坚硬，否则由于马达离开光阱的一小段距离，单一非行进性马达的力很难被测量。在这种情况下，光阱必须接近等长。另外，珠子和马达之间的连接必须非常坚硬，以防止马达仅将连接拉动。单一非行进性马达肌球蛋白的力范围很广（1～7 pN）（Finer et al. 1994；Molloy et al. 1995）。这提示实验中有很大的系统误差，原因很可能就是珠子和马达之间的连接硬度不足（Mehta and Spudich 1998）。

行进性马达的分析可以使用单一珠子几何学，在这里，马达和被光阱固定的聚苯乙烯珠子连接，纤维丝结合到玻璃盖玻片的表面。虽然这个几何学十分简单，但它也有某些限制。那些必须围绕纤维丝旋转前进的马达并不适合于单一珠子几何学。对于这种类型的行进性和非行进性马达，采用哑铃几何学（图 13-1，左，见图版）更为合适。在此设计中，纤维丝被两端的两个聚苯乙烯珠子固定（Finer et al. 1994）。其中一个珠子也可以始终和表面结合。这种束缚颗粒分析特别适用于围绕纤维丝旋转前进的行进性马达，如 RNA 聚合酶（Wang et al. 1998）。在哑铃实验中，稀疏的覆盖在盖玻片上的一层珠子作为马达的平面。当两个光阱中的纤维丝哑铃发生位移时，就可以测量步长。虽然需要双光阱系统，但对于肌动蛋白依赖的分子马达，仅需在一个光阱上使用力回馈系统就可以准确地测量马达的步长（Rock et al. 2001）。Kerssemakers 等（2006）开发了一种高效、自动的在数据结果中鉴定单步转移的方法。利用这种方法对肌球蛋白 V 和

VI 的分析见下。

## 用单珠光阱分析行进性马达

对于肌球蛋白 V 的单一珠子几何学分析，中性链亲和素包被在盖玻片上，之后生物素化的激动蛋白纤维结合在表面上（Rock et al. 2000）。对于微管蛋白依赖的马达，微管蛋白被非特异性地吸附在多聚赖氨酸包被的盖玻片上（Visscher et al. 1999）。另外还可将轴丝（20 个微管蛋白集成的束）直接吸附在玻璃上（Thorn et al. 2000）。

GFP-马达融合体经常被用于马达和聚苯乙烯珠子的定向结合。许多重组表达的细胞骨架马达都和 GFP 融合，GFP 通常构建在螺旋-螺旋区的末端，这样不会干扰马达的正常功能。GFP 已经被用于将多种重组的驱动蛋白和肌球蛋白定向地结合于珠子或盖玻片表面（Thorn et al. 2000；Rock et al. 2001）。如果 GFP 能用于单分子运动观察，那么它也可以用于该马达分子的光阱实验（Thorn et al. 2000；Rock et al. 2001）。这种方法不需要特意将马达蛋白的非功能区和珠子结合。例如，鱿鱼轴浆驱动蛋白更适合于和羧基化珠子结合，因为其螺旋-螺旋区域含有一个正电区（Svoboda et al. 1993；Visscher et al. 1999）。然而，其他一些马达蛋白的非特异结合可能会导致蛋白质的变性或活性的丧失。因此 GFP 融合介导的定向结合是一个更好的选择。

实验方案 1 介绍了 GFP 单克隆抗体和 0.3～1 μm 的羧基化珠子的结合。我们还可以使用硫-*N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和 *N*-乙酰-*N*′-(二甲氨基丙烷基)-羧二酰亚胺（EDC）作为偶联剂将羧基化珠子和 GFP 多克隆抗体的 N 端结合（Thorn et al. 2000）。之后 GFP-马达融合蛋白就可以通过抗体以正确的方向和珠子结合。GFP 抗体和珠子结合后可以在 4℃保存 3 天。珠子不能保存在还原性溶液中，这会降解抗体。驱动蛋白和肌球蛋白与珠子 44℃孵育 10 min 就可以结合到珠子上（Thorn et al. 2000；Rock et al. 2001）。

珠子的大小对于光阱实验很重要。大珠子（约 1 μm）更容易被光阱捕获，而且光阱刚度更高。小珠子（0.2～0.3 μm）的时间分辨率更高，因为其 $f_c$ 更高。对于 1064 nm光阱，小珠子的刚度较低（Simmons et al. 1996），但其分辨率和大珠子相比并没有降低（Visscher et al. 1999；Rief et al. 2000）。当时间分辨率达到亚毫秒级时，我们就需要小珠子（Nishiyama et al. 2001）或刚性非常高的光阱，因为珠子的 $f_c$ 也是决定光阱刚度的因素之一。在桌面离心机中离心，珠子不能小于 0.5 μm。由于珠子和马达偶联时会经常遇到离心步骤，因此更小的珠子应采用柱式纯化法。0.5 μm 珠子的实验步骤和 1 μm 珠子是一样的，都需要过量的抗体来包被珠子。然而，当马达和小珠子结合时，马达蛋白的浓度可能需要更高，因为小珠子的表面积与体积比更大。

## 对非行进性马达和必须绕微丝旋转的马达之哑铃分析

和单一珠子光阱几何学不同，行进性和非行进性马达，以及旋转型马达均可采用哑铃分析（图 13-1，左，见图版）。哑铃分析还适用于马达和珠子之间的连接臂很短的情况，因为它可以使被捕获的珠子和表面的距离拉远 1 μm ，因此可以更容易使活化的马达和纤维丝结合。对于哑铃几何学，纤维被固定在两个 1 μm 聚苯乙烯珠子之间。盖玻片的表面覆盖着 1.5 μm 的玻璃珠，作为马达的平台。因此，被捕获珠子距离盖玻片表

面约1 μm。纤维丝和马达向一个方向的拉力和被捕获珠子的光阱力相抗衡。肌球蛋白的哑铃实验是由生物素化肌动蛋白纤维和中性链亲和素珠子构成的（Rock et al. 2000）。类似的，非行进性驱动蛋白家族成员 NCD（deCastro et al. 2000）的光阱研究，是由生物素化微管蛋白和中性链亲和素珠子构成。实验方案 2 介绍了 GFP 重组融合到肌球蛋白 V 和肌球蛋白 VI 上的方法（Rock et al. 2001）。

## 力钳的应用

力钳对于研究马达分子的运动特征十分重要。图 13-5 介绍了利用单一珠子几何学光阱反馈实现的肌球蛋白 V 的步行追踪（Rief et al. 2000）。类似的结果也可以利用哑铃几何学得到（图 13-1，左，见图版）。如果马达在纤维上的运动路径相对灵活（如肌动蛋白），我们可以仅在两个珠子中的一个上做力反馈，实现精确的步长测量。对于纤维非常坚固的微管蛋白研究，则需要两个珠子均做力反馈。使用两个光阱进行力钳测量时，我们必须知道两个光阱的刚度。因为马达会拉一个珠子，而推另一个珠子，我们要维持两个珠子的力的恒定和珠子间距离的恒定。对于肌动蛋白分析，张力负荷在短距离内是可以忽略的。当迈步移动时，肌球蛋白会把自己拉向一个珠子（如图 13-1 中左边的珠子，见图版），而把纤维丝推向另一个珠子（如图 13-1 中右边的珠子，见图版）。肌球蛋白对其产生拉力的珠子（图 13-1 中左边，见图版）用于力反馈。如果肌动蛋白纤维的固定有一定的松弛性的话，则在左边珠子力反馈的范围内（在这里约 300 nm），右边的珠子不会移动，因此不会对系统的其他组件造成影响。

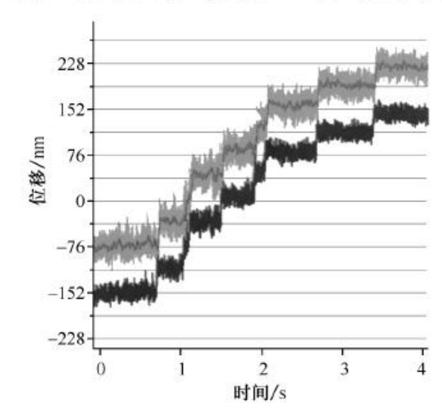


图 13-5　力钳技术实现的肌球蛋白 V 的步行追踪。（深色线）被捕获的聚苯乙烯珠子位置的未滤过数据（Rief et al. 2000）。（浅色线）跟随珠子移动的光阱位置的变化，以维持恒加载。实验使用 3 μmol/L ATP。

## 确保观察在单分子水平

当确定光阱中的力、步长和马达的行进时，是否能够识别单分子的运动十分重要。多个马达分子产生的运动可能导致数据的误解和错误的结论。本章讨论的技术都很难确定马达分子的浓度，因为每个珠子结合的马达数决定于许多因素，包括抗体质量、珠子吸附的抗体分子数量等。

为了确定一个未知的马达是否在行进中，我们应该从高浓度的马达分子开始，再逐渐降低到单分子水平。马达的运动应该通过传统显微镜和隐失场显微镜来鉴定。传统显微镜可以确定马达是否在行进，而隐失场显微镜可以对马达的行进做更直接和准确的测量（Rock et al. 2000）。简单来说，传统显微镜从马达分子的高浓度逐渐降低到单分子水平来确定马达的运动。维持纤维运动所需的分子数可以用泊松统计得到（Block et al. 1990）。GFP 和 GFP 抗体的相互作用对研究马达的行进很有帮助，它可以用于传统显

微镜分析以决定达到大分子运动所需的马达分子密度。这一密度条件被用于光阱。GFP 还可以用于隐失场显微镜对行进中分子马达运动的成像（Rock et al. 2001），不过，采用其他的荧光探针效果更好（如 Cy3 和 Cy5）。

## 小结

光阱技术可以直接检测马达分子的速度、力学、步长和行进移动距离。力回馈技术能够在极高的分辨率下测定马达的步长，研究 ATP 酶的酶动力学和步速。如今，光阱系统的设计已经大大简化，并且添加了光阱刚度控制、定位控制、多重光阱、力回馈、定位回馈等多项新功能。光阱用于分子马达的研究已有十余年。没有这项技术，我们很难达到如今的知识水平。光阱的不断发展使这项技术成为揭示分子马达和其他以力学和运动为关键特性的生物系统的机制最强有力的工具。

# 实验方案 1：GFP 抗体偶联珠子

本实验方案介绍了将 GFP 抗体和珠子偶联的方法。GFP-马达融合蛋白之后就可以吸附到柱子上，用于单分子运动研究和光阱实验。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

α-GFP 抗体（鼠单克隆抗体，0.05 mg/ml 溶于 PBS [3E6 antibody]；Qbiogene, Inc.，Carlsbad，California）

珠子（羧基化微球体，直径 0.5～1 μm；Polysciences，Warrington，Pennsylvania）

四甲罗丹明异硫氰酸盐标记小牛血清白蛋白（TMR-BSA；Sigma-Aldrich）＜!＞

PBS（100 mmol/L）

### 设备

培养箱，预设 22℃

## 方法

1. 10 μl 珠子重悬于 100 μl PBS。22℃，20 000 *g* 离心 1 min。
2. 100 μl PBS 重悬珠子，重复步骤 1。
3. 用 20 μl GFP 抗体＋1 μl TMR-BSA 重悬珠子。22℃孵育 5 min。
4. 22℃，20 000 *g* 离心 1 min。
5. 20 μl PBS 重悬珠子。
6. 重复步骤 4 和步骤 5 三次。

# 实验方案 2：用于非行进性马达或旋转型马达的哑铃实验

此实验方案介绍了生物素化肌动蛋白纤维和包被聚苯乙烯珠子的盖玻片的制备。它们可以用于光阱哑铃实验，以研究马达和纤维之间的相互作用。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 设备

α-GFP 抗体（鼠单克隆抗体，0.05 mg/ml 溶于 PBS [3E6 antibody]；Qbiogene，Inc.，Carlsbad，California）

AB（25 mmol/L imidazole HCl ＜!＞、pH 7.4，25 mmol/L KCl，5 μmol/L calmodulin，1 mmol/L EGTA，10 mmol/L DTT ＜!＞，4 mmol/L $MgCl_2$，2 mmol/L ATP）

ABSA（AB ＋ 1 mg/ml BSA）

ATP

珠子（聚苯乙烯珠或玻璃珠，1～2 μm）重悬于 0.1% Trition X-100 ＜!＞

生物素化肌动蛋白（50 μmol/L；制备方法见 Rock et al. 2000）

KCl ＜!＞

马达分子（如肌球蛋白 VI）

NAV 珠子 [1 μm 生物素化聚苯乙烯珠子，中性链亲和素包被，ABSA 彻底清洗（Rock et al. 2000)]

硝化棉（0.1%溶于乙酸异戊酯 ＜!＞）

$O_2$ 清除剂（25 μg/ml 葡萄糖氧化酶＜!＞、45 μg/ml 过氧化氢酶）

PBS ＋ 50% 甘油，－20℃保存。使用时加入 0.1% 葡萄糖。

四甲罗丹明（TMR)-鬼笔菌素（Invitrogen）＜!＞

### 设备

水浴锅

盖玻片（18 $mm^2$）

双面胶

真空油脂

## 方法

### 生物素化肌动蛋白纤维的制备

1. 融化 50 μm 生物素化肌动蛋白。浴式超声器中超声 30 s。4℃静置 1 h，使可能存在的肌动蛋白复合体解聚。

2. 加入 KCl（50 mmol/L）和 ATP（2 mmol/L）。4℃静置 1 h 使肌动蛋白聚合。

   结果会产生很长的纤维（≥10 μm）。

3. 使用前加入约 50 μmol/L TMR-鬼笔菌素。

   肌动蛋白纤维在 4℃下可储存 1 周。

### 包被珠子的盖玻片制备

4. 浴式超声器中超声珠子 30 s。
5. 在盖玻片上包被单层超声后的珠子。珠子溶液在 595 nm 下吸光度为 0.15 时，包被效果较理想。
6. 将盖玻片在 0.1%硝化棉溶液中浸过，干燥。

### 流动槽的制备

7. 使用包被珠子的盖玻片和双面胶制作流动槽（Rock et al. 2000）。
8. 用 GFP 抗体包被盖玻片表面。静置 4 min。
9. 10 μl ABSA 洗玻片。
10. 马达溶液流过流动槽，溶液的浓度以实现单分子流动性为标准。静置 4 min。

    对于肌球蛋白 VI，溶液浓度为≤1 nmol/L。

11. 10 μl ABSA 洗玻片。
12. $O_2$ 清除剂、ATP（纳摩尔到毫摩尔浓度级别）、1∶300 NAV 珠子和 1∶4000 TMR-肌动蛋白的混合液（AB 稀释）流过流动槽。
13. 将流动槽的边缘用真空油脂封闭。样品即可用于成像。

## 致谢

在此，感谢 Henrik Flyvbjerg 教授的意见和对一些章节的校对。本文由美国 NIH 基金（GM33289）资助。

## 参考文献

Ashkin A. 1998. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Methods Cell Biol.* **55:** 1–27.

Berg-Sorensen K. and Flyvbjerg H. 2004. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 594–612.

Berg-Sorensen K., Oddershede L., Florin E.-L., and Flyvbjerg H. 2003. Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers. *J. Appl. Physics* **93:** 3167–3176.

Berg-Sorensen K., Peterman E.J.G., Weber T., Schmidt C.F., and Flyvbjerg H. 2006. Power spectrum analysis for optical tweezers. II. Laser-wavelength dependence of parasitic filtering and how to achieve high bandwidth. *Rev. Sci. Instrum.* **77:** 063106-1–063106-11.

Berns M.W., Aist J.R., Wright W.H., and Liang H. 1992. Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. *Exp. Cell Res.* **198:** 375–378.

Block S.M., Goldstein L.S., and Schnapp B.J. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348:** 348–352.

Bryant Z., Altman D., and Spudich J.A. 2007. The power stroke of myosin VI and the basis of reverse directionality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 772–777.

deCastro M.J., Fondecave R.M., Clarke L.A., Schmidt C.F., and Stewart R.J. 2000. Working strokes by single molecules of the kinesin-related microtubule motor ncd. *Nat. Cell Biol.* **2:** 724–729.

Finer J.T., Simmons R.M., and Spudich J.A. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368:** 113–119.

Franklin G.F., Powell J.D., and Emami-Naeini A. 1994. *Feedback control of dynamic systems*, 3rd ed. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.

Gelles J., Schnapp B.J., and Sheetz M.P. 1988. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature* **331:** 450–453.

Gittes F. and Schmidt C.F. 1998. Signals and noise in microme-

chanical measurements. *Methods Cell Biol.* **55:** 129–156.

Hansen P.M., Tolic-Norrelykke I.M., Flyvbjerg H., and Berg-Sorensen K. 2006. Faster version of Matlab package for precise calibration of optical tweezers. *Comput. Phys. Commun.* **175:** 572–573.

Howard J., Hudspeth A.J., and Vale R.D. 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* **342:** 154–158.

Kerssemakers J.W., Munteanu E.L., Laan L., Noetzel T.L., Janson M.E., and Dogterom M. 2006. Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* **442:** 709–712.

Kron S.J. and Spudich J.A. 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83:** 6272–6276.

Mehta A. 2001. Myosin learns to walk. *J. Cell Sci.* **114:** 1981–1998.

Mehta A.D. and Spudich J.A. 1998. Single myosin molecule mechanics. *Adv. Struct. Biol.* **5:** 229–270.

Mehta A.D., Finer J.T., and Spudich J.A. 1997. Detection of single-molecule interactions using correlated thermal diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 7927–7931.

———. 1998a. Reflections of a lucid dreamer: Optical trap design considerations. *Methods Cell Biol.* **55:** 47–69.

———. 1998b. Use of optical traps in single-molecule study of nonprocessive biological motors. *Methods Enzymol.* **298:** 436–459.

Mehta A.D., Rief M., and Spudich J.A. 1999a. Biomechanics, one molecule at a time. *J. Biol. Chem.* **274:** 14517–14520.

Mehta A.D., Rief M., Spudich J.A., Smith D.A., and Simmons R.M. 1999b. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science* **283:** 1689–1695.

Mehta A.D., Rock R.S., Rief M., Spudich J.A., Mooseker M.S., and Cheney R.E. 1999c. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400:** 590–593.

Ménétrey J., Bahloul A., Wells A.L., Yengo C.M., Morris C.A., Sweeney H.L., and Houdusse A. 2005. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature* **435:** 779–785.

Molloy J.E. 1998. Optical chopsticks: Digital synthesis of multiple optical traps. *Methods Cell Biol.* **55:** 205–216.

Molloy J.E., Burns J.E., Kendrick-Jones J., Tregear R.T., and White D.C.S. 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* **378:** 209–212.

Neuman K.C. and Block S.M. 2004. Optical trapping. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 2787–2809.

Neuman K.C., Abbondanzieri E.A., and Block S.M. 2005. Measurement of the effective focal shift in an optical trap. *Opt. Lett.* **30:** 1318–1320.

Neuman K.C., Chadd E.H., Liou G.F., Bergman K., and Block S.M. 1999. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophys. J.* **77:** 2856–2863.

Nishiyama M., Muto E., Inoue Y., Yanagida T., and Higuchi H. 2001. Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nat. Cell Biol.* **3:** 425–428.

Rice S.E., Purcell T.J., and Spudich J.A. 2003. Building and using optical traps to study properties of molecular motors. *Methods Enzymol.* **361:** 112–133.

Rief M., Rock R.S., Mehta A.D., Mooseker M.S., Cheney R.E., and Spudich J.A. 2000. Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9482–9486.

Rock R.S., Rief M., Mehta A.D., and Spudich J.A. 2000. In vitro assays of processive myosin motors. *Methods* **22:** 373–381.

Rock R.S., Rice S.E., Wells A.L., Purcell T.J., Spudich J.A., and Sweeney H.L. 2001. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 13655–13659.

Schaffer E., Norrelykke S.F., and Howard J. 2007. Surface forces and drag coefficients of microspheres near a plane surface measured with optical tweezers. *Langmuir* **23:** 3654–3665.

Schnitzer M.J., Visscher K., and Block S.M. 2000. Force production by single kinesin motors. *Nat. Cell Biol.* **2:** 718–723.

Sheetz M. 1998. *Laser tweezers in cell biology*. Academic Press, San Diego.

Sheetz M.P. and Spudich J.A. 1983. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* **303:** 31–35.

Simmons R.M., Finer J.T., Chu S., and Spudich J.A. 1996. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.* **70:** 1813–1822.

Smith S.B., Cui Y., and Bustamante C. 1996. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* **271:** 795–799.

Spudich J.A., Kron S.J., and Sheetz M.P. 1985. Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin. *Nature* **315:** 584–586.

Steffen W., Smith D., Simmons R., and Sleep J. 2001. Mapping the actin filament with myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 14949–14954.

Sterba R.E. and Sheetz M.P. 1998. Basic laser tweezers. *Methods Cell Biol.* **55:** 29–41.

Svoboda K. and Block S.M. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23:** 247–285.

Svoboda K., Schmidt C.F. , Schnapp B.J., and Block S.M. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365:** 721–727.

Thorn K.S., Ubersax J.A., and Vale R.D. 2000. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J. Cell Biol.* **151:** 1093–1100.

Tolic-Norrelykke S.F., Schaffer E., Howard J., Pavone F.S., Julicher F., and Flyvbjerg H. 2006. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back-focal-plane. *Rev. Sci. Instrum.* **77:** 103101–103111.

Toyoshima Y.Y., Kron S.J., Mcnally E.M., Niebling K.R., Toyoshima C., and Spudich J.A. 1987. Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature* **328:** 536–539.

Uyeda T.Q., Warrick H.M., Kron S.J., and Spudich J.A. 1991. Quantized velocities at low myosin densities in an in vitro motility assay. *Nature* **352:** 307–311.

Vale R.D., Reese T.S., and Sheetz M.P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42:** 39–50.

Veigel C., Wang F., Bartoo M.L., Sellers J.R., and Molloy J.E. 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat. Cell Biol.* **4:** 59–65.

Visscher K. and Block S.M. 1998. Versatile optical traps with feedback control. *Methods Enzymol.* **298:** 460–489.

Visscher K., Gross S.P., and Block S.M. 1996. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-level resolution position sensing. *IEEE J. Select. Top. Quantum Elect.* **2:** 1066–1076.

Visscher K., Schnitzer M.J., and Block S.M. 1999. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* **400:** 184–189.

Wang M.D., Schnitzer M.J., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S.M. 1998. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* **282:** 902–907.

Yanagida T. and Iwane A.H. 2000. A large step for myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9357–9359.

（王毓斌　译）

# 第14章　高分辨双光阱光镊的差分检测

**Carlos Bustamante**,[*,†,‡] **Yann R. Chemla**,[*,§] **and Jeffrey R. Moffitt**[*,†]

[*] Department of Physics, [†] Howard Hughes Medical Institute, [‡] Department of Molecular & Cell Biology, and [§] Department of Chemistry, University of California, Berkeley, California 94720, [§] 现在地址：Department of Physics, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

## 摘要

本章主要介绍在生物系统中，实现高分辨检测进程和相互作用的双光阱系统的设计、制作以及使用。这套设备的强大功能可以在DNA转运酶的应用上得到体现。具有此特殊的高分辨率的双光阱设计的设备可以将信号源和环境噪声解离，从而使信号干扰最小化并使信号的稳定性和空间分辨率达到最大化。

## 概述

2006年是Askin等发表有关分阶光阱的重要论文的20周年纪念（1986），该论文第一次证明了：一根被聚焦的光可以稳定地捕获微米大小的电解质对象。在那个时候，光阱或光镊变成一种研究基础生物过程的不可或缺的工具。这种操纵和检测单分子或者分子复合物的能力，使得对细胞基本组成成分的机械特征，以及其分子机器工作机制有了一种更新、更精细的了解（Mehta et al. 1999；Bustamante et al. 2000，2003；Williams and Rouzina 2002）。过去20年里这种工具运用到各种生物系统的研究中，可以看到这个领域的稳固发展，使得这项技术更加精准。一个主要的努力就是发展方法以便分析埃水平的运动，因为很多生物过程都是以埃为基本单位的。最近伴随着对DNA的单一碱基对，3.4Å水平的运动的高分辨率光阱技术的到来，这些努力才有了一些成果（Nugent-Glandorf and Perkins 2004；Abbondanzieri et al. 2005；Moffitt et al. 2006）。新的设备可以实现对于细胞力学过程的更加深入的理解。

本章的目的是引导研究者去设计、制作和利用能用于高分辨应用的光阱系统。这并不是要去回顾这个领域的所有的研究进展，而是去描述在制作这套设备时遇到的技术要点和问题，以及我们的团队是怎么样处理这些问题的。因此，本章要求研究者具有一些光阱理论、设计和使用的基础知识。为了帮助那些对光阶基本知识不太熟悉的研究者，我们将简单回顾一下关于光阱的基本概念和组成部分，以及使用到这些技术的单分子实验，本章给研究者提供了大量的优秀综述以供参考①。

### 光阱的基础知识

由于光携带有动量，所以一个物体反射或者折射一束光，光束将施加一个力到这个

① Lang和Block（2003）提供了关于光镊的文献的全面的列表（按照它的出版日期），是一个为读者寻找更深入讨论的很好的起点。

物体上。尽管这样的力很小，一般在每毫瓦光几个皮牛数量级（Askin 1970），但是足可以操控微米大小的介质目标，如一个聚苯乙烯珠子。如果光通过一个透镜聚焦在一起，那么焦点附近的物体就会被捕获，并遭遇一个大小与光密度空间分阶成正比的回复力（Askin et al. 1986）。在靠近光束中心的空间，光阱的作用就像“胡克光弹簧”，施加于物体的力量与物体位移成比例。具有代表性的光阱是用一个高数值孔径（NA）的显微镜物镜把溢出物镜后孔径的近红外（NIR）激光聚焦于衍射极限光点产生的。因此，在一个微流体容器中形成的光阱，可以用来直接作用并测量一个珠子以及这个珠子附着的生物系统上的力。

在大多数单分子光阱实验中，一个单独的分子被束缚在光阱珠子和第二个附着点之间，如一个样品池的表面（Metha et al. 1999），或者第二个珠子的表面，这个珠子可以被吸到微吸管的末端（Bustamante et al. 2003），也可以被附加的光阱俘获（Shaevitz et al. 2003）。通过操纵相对应于另一端的栓系的一端，力能通过光阱珠子施加到这个分子上。更为重要的是，这些珠子的移动，是由于改变栓系的长度或者附着点引起的，

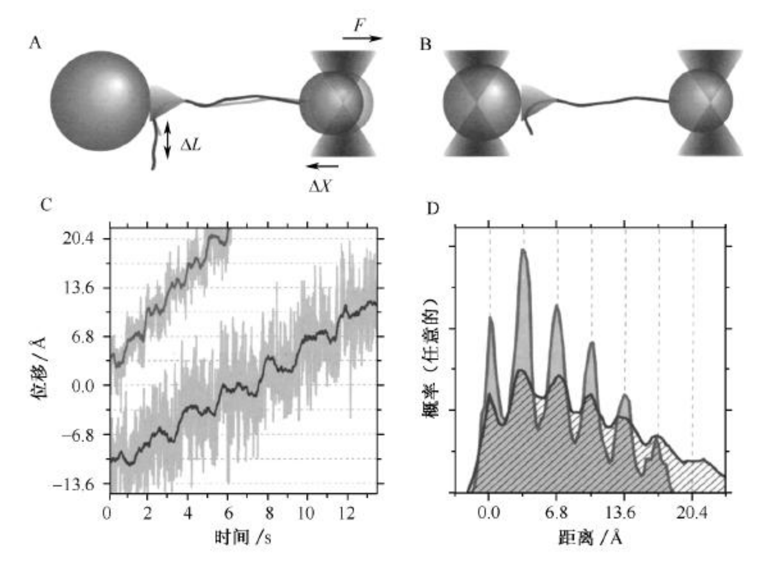



图 14-1　用双光阱光镊观察 DNA 碱基对的运动。A. 典型的光镊实验。生物系统的作用，如 DNA 移位酶，能改变被拉伸 DNA 系绳的伸展长度（$\Delta L$ 表示），该过程可用光阱珠子的移动 $\Delta x$ 来检测。B. 双光阱光镊。同一个激光形成的双光阱钳住了系绳分子两个末端。C. 用具有差分检测的双光阱光镊展示单一碱基对的分离。图中显示的观察到的阶段是两个光阱之间的距离，860 nm 的聚苯乙烯珠子被一个 1 μm 的 dsDNA 系绳后，增加了 3.4 Å 的增量，模拟了单个碱基对轮廓长度的减少。较低的曲线相对应的是在具有相等刚度约 0.1 pN/nm的光阱，张力约 7 pN 时的 2 s 阶段，高点的曲线对应的是光阱刚度约 0.3 pN/nm，张力约 20 pN 时的 1 s 阶段。数据经 boxcar 滤波为从 100 Hz（灰色）到 2 Hz（黑色，较低）或者 4 Hz（深灰色，较高）。D. 过滤曲线两两分布。较高的曲线（滤过的）分布与较低的曲线（模式化的）分布的对比显示了张力分辨率的发展。C 图中较低的曲线以及 D 图中相对应的两两分布选自 Moffitt 等。（2006 [© National Academy of Sciences]）

可以作为检测生物系统行为研究中的探针，如图 14-1A 所示。在这种方式中，光阱可以被应用到追踪以肌动蛋白和微管为基础的运动（Metha et al. 1999），核酸以及蛋白质二级和四级结构的机械展开（Metha et al. 1999；Williams and Rouzina 2002），以及很多核酸移位酶的运动（Bustamante et al. 2003）。通常的，这些运动发生在离散步骤，当这些运动被直接检测到的时候，可以很好地了解这些系统的基础机制。在 DNA 转运酶，即我们用来说明目的而贯穿全章的生物系统中，这些步骤是仅以一对碱基对为级别，直接观察则需要具备埃水平的敏感性。分辨这些运动的能力（我们定义为光阱的空间分辨率）被各种来源的噪声所限制，这些我们将详细讨论。

### 噪声问题

控制和最小化噪声是建立高分辨率光镊的关键。因此，噪声将是我们讨论的主线。第一部分，我们将描述环境来源的噪声（从地板振动到空气流动）怎样影响分辨率，并且我们提供选择合适环境建立高分辨率光阱的指导方针。第二部分，我们将介绍仪器设计，即用来自一个相同激光的两个正交偏振光珠（Moffitt et al. 2006）形成的双光阱（图 14-1B）。我们将讨论基于性能和稳定性的主要光学组件的选择，以及我们将仪器与来源于环境和元件本身的噪声分离开来的总体设计原则。第三部分，我们将讨论作用于光阱微球上的布朗力造成的光阱空间分辨率的基本限制。我们将重点描述这些限制是怎样约束实验参数，以及测量方法本身是怎样影响布朗噪声限制的分辨率的。我们证明通过检测两个光阱微球的位置，有可能使布朗噪声带来的不利影响最小化，并且优化系统设备的空间分辨率。如图 14-1C、D 中所示，结合本章所附的指导，能够建立一套可以检测长度变化像 1 bp 大小的高分辨率的光镊。

## 环境噪声

对于观察生物系统的埃级别运动，高稳定性比系统操作所需要的环境要求更严格。特别是，当环境噪声导致光阱相对于 DNA 系绳的第二个附着点作差异运动时，这就更是个问题。在这个部分，我们将讨论怎么营造一个安静的环境，噪声来源是怎么牵涉进来的，以及它们是怎么影响系统的。以我们的经验，三个主要的噪声源（房间振动、温度波动和气流）将决定设备的位置。

### 房间振动

地板的机械振动，可以通过引起不同光学组件的移动而导致噪声。根据设备在建筑物中的位置、局部环境（如接近嘈杂的设备、电梯、教室或者街道），甚至是一天中的不同时间，这些振动可以轻易地按照一个数量级或者更大的幅度改变。建筑物构造最稳定区是最安静的环境，通常在地下室或者建筑物的拐角。通常，准备放置设备的房间，应该直接用标准加速度计来评定振动。国际标准组织（ISO）和振动参数（VC）为振动提供了有用的标准，为不同环境定义了一套振动速度和加速度均方根频率曲线。例如，从嘈杂的车间（其间的振动显而易见）到最严格的 VC-E [这个通常是预留给最敏感的扫描电子显微镜（SEM）和透射式电子显微镜（TEM）]（Gordon 1992）。

这些振动以两种方式整合到系统中：通过支撑光镊的桌子的振动和各个光学组件自身的共振。地板振动可以引起光学桌子的共振形式的弯曲和扭动，这就会导致光学组件不同的运动。一般来说，这些共振的最小频率为 30～300 Hz。桌子越厚越矮，频率越大（这样的大频率很少由地板振动造成），一般位于感兴趣的测量范围以外。另外，一些制造商提供内置的减震器可以调节桌子的主导模式，将它们降低为原先的 1/3。桌子的移动也可以引起光学组件以及它们底座的共振，特别是在 10 Hz 及其以上频率的振动下。这里，也通常使用减震器减小共振或者使用厚的和矮的光学底座以增加共振频率。

大多数的光学桌子通过气体减震阀来分离地板振动。这样的分离装置像是一个过度阻尼的气体弹簧，在它们自然频率上每 10 个频率两个数量级来滤掉地板振动，自然频率通常为 1～3 Hz。然而，分离器不能滤掉低于它们共振频率的振动，实际上，通常的通过 3 Hz 以内的共振因子在 3 以内增加地板振动。尽管桌子和光学组件的自然频率低于上面提到的分离器 2～3 个数量级，地板 1～3 Hz 的振动仍然能够产生很大的移动。为了说明这一点，比较两个环境：我们的设备一个放置在繁忙的办公室，一个放在安静的地下室。从 ISO 标准推断，一个繁忙的办公室环境显示的是以 2 Hz，约 1000 μm/s rms（rms：有效值）的振动，接近于一个典型气体分离器的自然频率。一个具有共振频率为 100 Hz 的物体（如一个光学组件，或者一个薄的光学桌子）在这个环境中仍然可以以 2 Hz 100 nm rms 移动，通过气体分离器的共振导致振动放大 3 倍。相反地，我们的地下室显示的振动小于 2 Hz，1 μm/s（低于 VC-E 曲线），相应的只有小于 1 Å rms 的移动①。

振动噪声不仅可以通过地板还可以通过声音振动耦合到设备中去。在我们的经验中，声学噪声并不是以宽带频率很强的振动耦合到设备中，而是引发各个光学组件以及底座的共振频率。和地板振动一样，房间里的声音振动也存在标准分级。噪声标准（NC）以人的听觉表征了声学噪声，范围为 NC-15（安静的录音棚里的噪声），约 NC-50（嘈杂办公室的噪声）。具有额外的吸音泡沫的设备房间中，在去除所有的风冷设备的同时，房间的噪声将降低到 NC-35 以下，我们将观察不到声音引起的共振。

### 温度波动

温度变化可以导致仪器的严重漂移。一个简单的“信封背面”计算显示，一个 4 in（1 in＝2.54 cm）高的不锈钢光学支柱将随着温度每变化 0.1℃增加大约 200 nm。因此，周围温度的变化可能会使两个用不同方式固定的组件之间产生纳米级别的漂移也就不奇怪了，如样本台与形成光阱的物镜。漂移未必是平移式的，温度每改变 1℃可以使像可调镜底座这类运动式光学组件在定向上发生几微拉德的改变，而在样品平面，光阱就会产生几纳米的移动②。在我们实验室，一天内不可控的温度变化通常为 1～2℃，这样的变化大多发生在早上学生到来并打开仪器和照明灯的时候。通过反馈控制组合式空

---

① 低于其共振频率 $f_0$，一个理想的光学元件被在频率为 $f$ 的共振速度 $v_{rms}$ 驱动时，被折射为 $\delta_{rms}=Av_{rmsf}/2\pi f_0^2$，其中 $A(f)$ 是气动隔离器的滤波函数。

② 一个物镜转换角度 $\theta$ 到样本平面的某个位置 $\Delta$via$\Delta=f_{OBJ}\theta$，其中 $f_{OBJ}$ 是物镜的焦距，通常在标准的高 NA 的物镜是几个毫米。

调，我们能够较好地维持设备房间内的温度（见下文）。

如果温度变化缓慢，且比大多数实验时间标度还要慢时，它影响较小；然而，当对设备突然加热时可以使温度变化与时间标度较为相关，如当一束激光打开或者当一个光学组件被接触时。人接触造成的足够热沉积产生的维持在半小时的漂移是能够被观察到的（与 S. W. Grill 的个人交流）。另外，被显微物镜吸收的 NIR 光阱光线也具有观察得到的影响。用像 100 mW 一样小的入射光，物体焦距为每分钟几纳米的热漂移可以被观察到。在这两种情况下，很少能够通过环境去减少漂移。因此，有必要去设计一个对于这些噪声来源不敏感的设备，下面将进行详细的讨论。

### 气流

气流，像地板振动一样，可以在设备中产生机械共振。更为重要的是，最轻微的气流也可以引起光阱珠子的方向和位置产生巨大波动。这些都是因为空气密度的波动可以导致折射率的空间变化。相似的现象被应用到纹影摄影技术中，它可以使对流、冲击波，以及其他大气扰动成像（Settles 2001）。在我们的经验中，样品台上的光阱在微弱气流的存在下可以产生低频率的几十纳米的波动。图 14-2A 显示的是通过屏蔽塑料围栏中的光以及进一步使设备房间中气流最小化，可以使光阱珠子的位置波动系统性地减小。

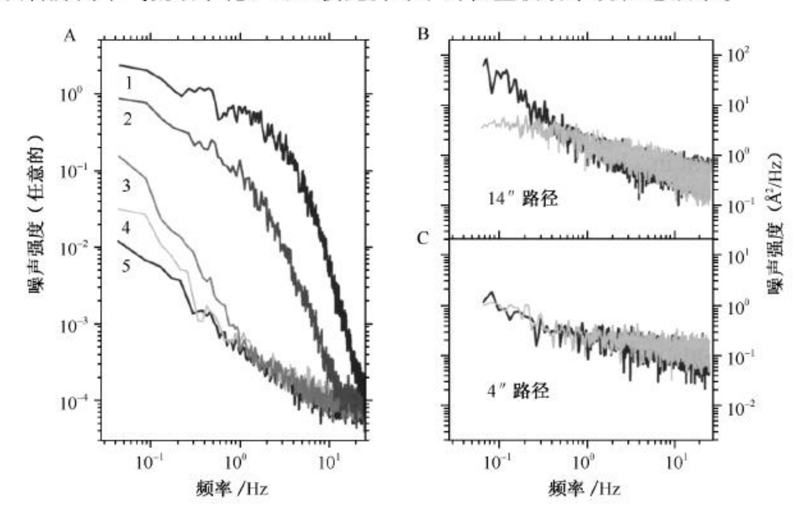



图 14-2　隔离空气波动产生的效果。A. 用覆盖光学通路减少噪声。显示的是不被环境风冷气流（图 14-3 中设备设计图）影响的设备的不同部分，检测到的 845 nm 光阱激光位置波动。轨迹相对应于（1）只有物镜和检测光暴露，（2）只有物镜暴露，（3）所有的光通路被覆盖，（4）所有的光通路被覆盖，同时气流最小，（5）电的背景低噪声。光谱为任意单位并且是平均的 25 倍。B、C. 氦气和短差路径下的噪声减小。通过检测具有微弱监控珠子的强光阱珠子位置来测量两个光阱的相对位置。一个 14 in 的差分光通路（B），有氦气（灰色）存在可以移除存在于环境温度中的额外低频率波动（黑色）。相反的，在具有 4 in 差分通路的设备中（C），氦气没有什么帮助。B、C 图中，通过监测 1260 nm 和 860 nm 直径的珠子来收集数据。

然而，我们观察到，并且其他的研究者已经报道过（Abbondanzieri et al. 2005），

即使光被完全屏蔽，光围栏中的背景空气密度波动仍然能够产生很大的影响。一个报道过的能减少这种影响的方法是，如图 14-2B 中所示，用氦气覆蔽光（Abbondanzieri et al. 2005）。由于折射率的变化，$\Delta n$，以 $\Delta n=(n-1)\Delta\rho/\rho$，其中 $\rho$ 是空气密度（Settles 2001）。氦气的 $(n-1)$ 大约是空气的 1/10，同样的空气密度波动产生的折射率改变为原先的 1/10。图 14-2C 显示，能够用这种方法设计设备，从而减小这种波动的影响，下面将进行详细的讨论。

### 有关环境噪声的指南

以讨论环境噪声为基础，我们提供以下指南，以便为高分辨设备选择合适的场所。

1. 在一个安静的环境中操作设备。为了安置我们的高分辨设备，我们使用了我们建筑中第一层地下室，它显示的振动水平低于振动标准 E 曲线（Gordon 1992）。为了对抗声学噪声，这个房间含有一个分开的隔音罩，其中只有光阱和一架安静的电子设备。所有的具有扇的电子设备，如电脑，都要被放置在外面。
2. 将光学桌子和组件共振频率最大化。我们使用面积为 4 ft×6 ft（1 ft＝0.3048 m），厚度为 24 in 的光学桌子（790 系列；Technical Manufacturing Corporation，Peabody，Massachusetts），它显示的共振频率超过 250 Hz，并且将这个桌子浮在 4 个具有低于 2 Hz 的共振频率的气体隔离物上（Gimbal Piston Isolators；Technical Manufacturing）。另外，我们的所有光学组件固定在一个 1 in 直径的支柱上。
3. 控制设备房间的温度。我们使用定制的 HVAC 空调系统来达到这一点，将室温保持在固定值的 0.1℃ rms 范围内。在设备房间，气流非常弱，以便将空气噪声最小化。
4. 人接触设备最少化。设备中所有的移动部分，如样品台，都要通过由设备房间外面使用者操作的机械传动装置来操作。在实验过程中除了装载样品，使用者不能进入到设备房间，以便消除暂时温度变化。
5. 尽可能地覆盖光通路。为了减小气流对光阱位置稳定性的影响，我们用 1/2 in 厚的塑料板定制成的屏蔽罩（McMaster-Carr，Los Angele，California）覆盖激光束的光通路（除了样品池附近的，这里需要光线通过）。薄的板能够像鼓膜一样振动，这样将声学噪声转变成机械变化，直接整合到设备中。

## 仪器设计

虽然选择将环境噪声降到最低十分重要，但是也可以通过仪器的设计使其对噪声来源的敏感性降低。在本节中，将介绍一种高分辨率的光镊的设计，并且着重介绍这种设计如何使仪器减少来自环境的振动。当然，高分辨率软件对仪器几个重要部件的效率要求非常高。我们将讨论相关参数来选择这些组件，并在这些部件均可选用的情况下来对比我们的选择。

### 双光阱设计

在 DNA 系绳附着于镜台的实验中，根据以上列举的噪声来源，分辨率会因为镜台和捕获物镜之间相对位置的漂移和起伏而受到显著限制。尽管在安静的地下室环境中以

及进行了温度控制，本研究组和其他研究者（Shaevitz et al. 2003；Nugent-Glandorf and Perkins 2004）均已经发现了在纳米数量级上相对的几纳米每分钟的漂移和低频率的波动。一种解决方法就是利用监视器来监控镜台的位置，通过一些基结点将镜台的波动从测量的信号中减掉（Nugent-Glandorf and Perkins 2004）。本实验和其他研究者采用的一种方法则是通过利用双光阱装置来控制 DNA 系绳的两边，从而将生物学系统的整个振动从过程中减去。这种双光阱光镊通过以同样的方法控制分子的两边，从而使其对机械组件的漂移和起伏的敏感性降低。

如前一节所讨论的，仪器也对热膨胀、光学设置的机械波动和光学通路中的空气密度波动敏感。在我们的仪器中，我们通过利用单个激光产生的两个正交偏振束来形成双光阱。结果，许多光学组件和大量光学通路传导是两个诱捕射束共用的，这样使一个光阱相对于另一个光阱的差别运动最小化。此外，这种光学的经济适用创造了一种简单而紧凑的仪器，并减少了易受环境波动影响的组件的数量。

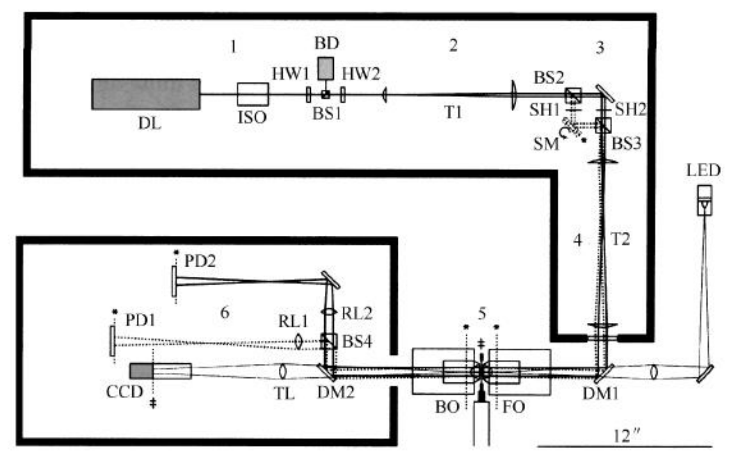



图 14-3 仪器展示。仪器由 6 个部分组成：（1）来自 NIR 激光器（DL；845 nm 或 1064 nm）的光穿过功率阶段，其由有两个机械化半波板（HW1 和 HW2）的光学分离器（ISO）组成，两个半波板分别接有一个偏振光束分裂器（BS1）和光束储存处（BD）（仅对于 1064 nm 系统）。（2）在第一个透镜上（T1；聚焦长度为 37.5 mm 和 175mm 的平凸透镜），光束被校正并扩展为最终大小的一半。（3）在后来的光束控制阶段，激光被一个分离器（BS2）分为两个正交偏振诱捕光束。s 偏振光束由一个压电镜（SM）控制，并通过另一个光束分裂器（BS3）与 p 偏振光束再结合。电动快门（SH1 和 SH2；SH-10；Boston Electronics，Brookline，Massachusetts）允许单独控制每个光阱。（4）第二个透镜（T2；聚焦长度为 100 mm 和 200 mm 的平凸透镜）将诱捕光束扩大为最终大小，并且将可操纵镜（*）平面成像于前物镜（FO）的后聚焦平面。（5）这个物镜在同一个样本槽内形成两个光阱，并且分散的光由一个相同的物镜收集（BO）。（6）在检测阶段，这个物镜的后聚焦平面通过两个独立的位置敏感光电检测器（PD1 和 PD2）上的两个接替镜（RL1 和 RL2；聚焦长度为 150 mm 的双面凸镜）成像，光电检测器上的最终光束分裂器分离独立的偏振（BS4）。两个双色镜（DM1 和 DM2）使得样本平台（≠）被来自 LED 的光照亮，并通过晶体管（TL；聚焦长度为 200 mm 双面凸镜）成像于 CCD 照相机上。两个塑料机壳（黑色厚导管）防止仪器室内光学的不同部分受空气波动的影响。

图 14-3 展示了本实验里的高分辨率双光阱光镊的基本设计。这个仪器包含 6 个部分：①激光器和功率部分，控制了每个诱捕射束的所有以及相关功率；②第一个光镜，校准和放大射束为其最终大小的一半；③射束控制部分，两个诱捕射束形成的地方（通过利用偏振分离入射光），分离相关射束，并使其重新结合；④第二个光镜，将射束扩展为最终大小并控制成像位于捕获物镜的后聚焦平面上；⑤物镜部分，也是物镜前的高 NA 通过将入射射束聚焦到样本槽中的两个衍射极限光斑上，从而形成这两个光阱的部分，两个也是后面物镜收集所传送射束的部位；⑥检测部分，光以偏振的方式被分离并成像于对位置敏感的光检测器上。下面分别介绍仪器的各个部件，详细了解各个光学部件的选择以及设计原理（在校正方法手册中包括这一章，另外我们还提供仪器校正的实用手册）。

## 激光器

用于光镊的经典激光器是接近红外（800～1100 nm）的，并且是功率为 50 mW～5 W的单个模式激光（Neuman and Block 2004）。我们讨论此部分的目的在于仅关心与高分辨率直接相关的激光特性：激光的功率、偏振和指向稳定性。

俘获激光的功率的波动会导致光阱刚度的改变。此外，在由同一个激光束的正交偏振形成的两个光阱的设计中，这个激光束偏振的改变也会引起每个光阱刚度的改变。在张力下单分子束缚的珠子在光阱中稍微偏离其平衡位置，从而来平衡一个或两个光阱中由于刚度改变而引起的分子上力的微小的改变。为了阐明这些微小改变的作用，我们研究了张力为 10 pN 的 DNA 一个 1 μm 分子捕获微珠范围的运动。1%激光功率的改变（$\Delta P/P$）也就是 1%光阱刚度的改变（$\Delta\kappa/\kappa$）会产生微珠的运动，该运动等同于 1 bp 长度的改变[①]。因此，高分辨率应用软件需要一个功率和偏振稳定性高于 1%的激光器。

激光器的指向稳定性（pointing stability）反映了激光头中射束角度波动的特征。在许多激光器中常常可观察到微拉德及以上数量级的角度改变，该变化是由激光头温度波动产生的，并转变为纳米级的光阱运动。双光镊的两个光阱由同一个激光器产生，优点在于其指向不稳定性可导致相同的光阱运动而不会有光阱的分离。当然，为了利用这个设计的优点，一旦把激光分成不同的偏振光态，应确保其中一个激光束角度扰动的符号与带有额外光学系统的另一激光束角度扰动的符号相反。

这里描述的仪器中，我们用了两种不同的激光器，低功率 200 mW，845 nm，光纤耦合电晶体激光器（LU0845；Lumics，Berlin）和高功率 5 W，1064 nm，二极管电晶体激光器（J20I-NL-106C；Spectra Physics，Mountain View，California）。光纤耦合的激光器表现为典型的高指向稳定性，因为光有效地由冷光源发出。然而，光通过光纤传播对机械干扰十分敏感。通过小心地使 845 nm 光纤耦合激光器对机械振动绝缘，直接将光纤用泡沫垫电缆钳（CCL-1；Newport，Irvine，California）固定于光学台子上，我们发现功率和偏振的稳定性均非常好，1 kHz 范围内 $<0.001\%$，超过 15 min 漂移$<0.1\%$。此外，指向不稳定性因太小而无法检测到，$<1$ nrad（图 14-4）。1064 nm

---

① 去观察相对于在张力 $F$ 下栓系长度 $L$ 的长度 $\Delta L$，刚度的波动 $\Delta\kappa/\kappa$ 必须服从 $\Delta\kappa/\kappa<\kappa_{DNA}\Delta L/F$。$\kappa_{DNA}$ 是栓系的刚度并在下文中进一步定义。

系统由激光光纤泵连接于激光头组成。虽然也小心地将这光纤机械隔离，但我们发现这个激光器的功率和偏振明显比 845 nm 激光器不稳定。功率波动通常约为 0.1%，峰峰时间跨度为 10～15 s。此外，在这里指向不稳定性可被检测到，大小为 1 μrad，如图 14-4 所示。虽然噪声增加，但是功率的显著增加使其能应用更大的力量作用于更小的微滴（>90 pN 于约 800 nm 直径微滴相对于 在 845 nm 系统中 < 15 pN 于相同微滴），使其成为一个更通用的仪器。另外，由于是大功率，所以使其能够在最优化的稳定性条件下（我们的激光器约为 2 W）及在功率上限以下使用激光器。遥控的旋转平台的一个半波板（Model 8401；New Focus，San Jose，California）和一个有束流分离器的大功率偏振射束分离器使得我们能够在十分稳定的功率下运行激光器并除去任何其他额外光。第二个半波板使其有可能控制每个偏振以及光阱的相关功率（图 14-3）。一个法拉第隔离器（IO-845-HP；IO-3-1064-VHP；分别用于 845 nm 和 1064 nm 系统；Optics for Research，Caldwell，New Jersey），使得光向前透过而不是反向透过，并且帮助防止因反射引起的额外功率波动，并提高激光器的寿命。

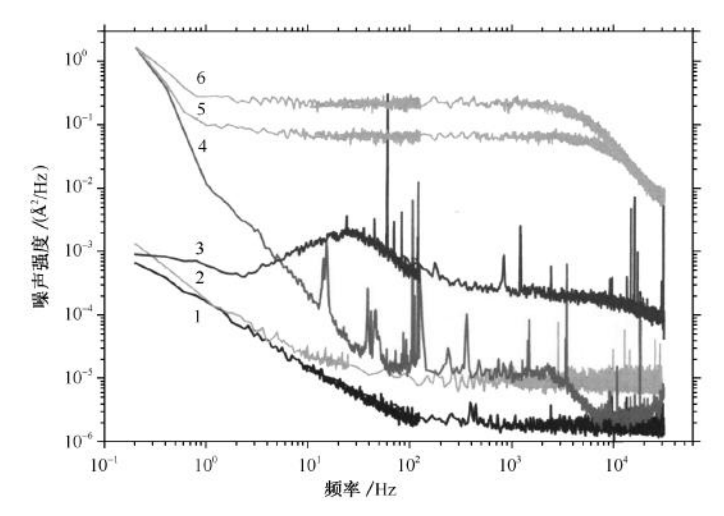



图 14-4　仪器噪声。仪器各种组件的噪声谱。显示的为（1）背景模糊噪声，（2）845 nm 激光，（3）可控制镜，（4）1064 nm 激光，为了进行比较，通过刚度约为 0.4 pN/nm（5）或约为 0.2 pN/nm（6）的 1064 nm 激光陷阱中单个 860 nm 聚苯乙烯珠的功率谱，分别地在样本平面的 860 nm 微珠噪声谱转化为等价的运动并被平均 100 次。激光噪声波通过一个位置敏感光电检测器监测一个诱捕光束的位置而收集。镜的噪声通过变形测量监测器电压信号测量。镜光谱中 60 Hz 的峰值是由功率导管噪声引起的，并不表示镜的实际运动。

## 第一光镜

一个牢固光阱的形成需要充分利用物镜的高 NA，通常通过扩大诱捕射束完成，因此光束束腰基本上等于诱捕物镜的后直径。引起光阱小的射束在轴向较弱，并且越大的射束会因诱捕边缘效率的增加而损失更多能量。多数激光器产生的射束最初都太小并有

发散。因此，有必要校准激光器并将光束束腰扩张到合适大小。在我们的仪器中，用一个约 5×光镜校准来自激光器的光，并将光扩大为最终诱捕大小的一半，约 4 nm。

## 光束操控

继第一光镜，波束操控镜台形成两个正交偏振光束，形成双光阱并操控一条光束相对于另一条。能够操控相对于其他的生物分子系绳的一端是光阱的基本要素，但是这也要对在理想的距离等级中操作方法不稳定负责。对于高分辨率的应用，一个光阱相对于其他的移动几微米的距离是至关重要的，但是移动埃的距离稳定。几种操控光阱位置的方法可以满足这些要求。通常的，这些方法是通过在成像于捕获物镜的后焦平面和转移到样本平面位置的光中，引入角度变化而实现功能。这些方法在速度、线性度，以及操控光束的功率的稳定性上各不相同，在这里，我们将向读者详细介绍这些并集中在两种常见的技术的简单比较的优秀文章。

第一种方法，也是我们自己用于仪器中的，是一个提供有超过最大带宽约 200 Hz，角稳定性约 20 nrad 的 2 mrad 双轴倾斜的压电驱动镜（Nano MTA-2；Mad City Labs，Madison，Wisconsin）。每个轴的内置应变片使闭合环路的漂移和滞后得到校正，并与压电系统一致。这个系统反射几乎所有的入射光并在整个过程中均以直线穿过。另一种常见的光处理方法就是利用声光偏转器（AOD）。简单地说，这个设备通过在晶体中穿行的声波衍射入射束而起作用，其频率敏感地控制了第一衍射射束的角度。与压电镜相比，双轴 AOD 系统通常的传播效率只有约 60%（Neuman and Block 2004）；更重要的是，这个效率会因为部分偏转角而改变，导致一些重要光阱刚度的变化。然而，AOD 角度的范围显著大于压电镜，由于角度由操作频率控制，因此它的稳定性也异常地高(一般，整个角度范围的一部分为 $10^{8}$)。AOD 的最大优势是高的角度调制速率，相比于压电镜的几百赫兹，其可达到大约 10 kHz。不过，我们发现对大多数的实验来说，压电镜 200 Hz 的带宽已经足够了。此外，镜的角度稳定性，转换为样本平面的光阱位移，低于我们所要求的 1 Å 稳定性，如图 14-4 显示的噪声谱。

如上一部分所述，射束的传播方向对折射率的局部改变敏感是由于空气密度的波动造成的。然而，假如两个诱捕射束由同一个光学通路传播，那么它们会受到同样的波动，导致没有相对的光阱运动发生。此外，要依据一个光阱调节另一个光阱的位置，必须在空间上分离诱捕射束。这种导致两条光学通路的不同空气波动可以用两种方法来最小化。第一种就是通过将其置于低折射率的密闭空间里，比如氦（Abbondanzieri et al. 2005）或如上所述的真空，来减少空气密度波动对折射率的影响。另一种方法就是使两条射束空间分离的光路长度最小化。在我们的仪器中，射束在处理后马上用偏振光束分离器调节，仅留下 4 in 特异的光学通路。图 14-2C 表示使空气波动影响最小化的设计，没必要创造低折射率的环境。

## 第二个光镜

使用第二个光镜有两个目的：①将束腰扩展为最终大小约 8 mm；②将可控射束成像。为了防止射束在物镜上调控时被切断，用一个透镜系统代替置于物镜后孔径上可变平面上的压电镜平面，如图 14-3 所示。我们也利用这个光镜来扩大诱捕射束的另一个

或两个因子，即来自基本光学系统，用同样的因素将角度缩小引入可控射束。这种设计保证了镜转化出比 1 Å 稳定性更好的光阱位置的角稳定性，并同时提供了一个合适的光阱运动范围（约 7.5 μm）。

### 物镜平台

一个物镜的选择依据多种标准，如它的 NA、NIR 谱的吸收和球面像差程度——文献很好地涵盖了这些主题（Neuman and Block 2004）。为达到我们的目的，我们转而关心油镜和水镜这两种普通物镜之间的微小差别，以及这些不同对仪器对环境敏感性的影响。

油浸物镜显然比水浸物镜有更高的 NA，这是由于油具有更高的折射率。为了减少高 NA 下的像差，油浸物镜必须将其镜头接近样品盖玻片几微米以内。当光阱从表面移入样本槽时，这些像差增加，也使光阱的形状和刚度发生了改变（Wuite et al. 2000；Neuman and Block 2004），有效地将光阱的刚度和相关的槽表面位移以及物镜的聚焦耦合。此外，表面附近微珠捕获的阻力系数因表面的流体力学关联而增加；这种作用提示了系统的基础布朗噪声，如下所述。

另外，由于水和槽内的缓冲液折射系数相似，水浸物镜的光阱不需要接近表面。捕获一般是在样品池内 50～100 μm 的深度完成，在这个距离里，微珠的边缘阻力系数可以忽略不计。而且，让其刚度与样品池或物镜的位移解耦合，诱捕射束的球面像差对样品池内光阱的深度比较不敏感（Wuite et al. 2000）。与油镜物镜相比，水浸物镜的缺点在于其 NA 较低。原则上，从可比较的设计上来说，小的 NA 提示水浸物镜不能像油浸物镜一样形成牢固的聚焦激光光阱，所以这就需要更大的激光功率来形成相似刚度的光阱。根据我们的经验，这种光学效率的减少所带来的好处超过了远离表面和增加样品池内的捕获深度所带来的好处。

据这里所描述的仪器，我们利用一种背部孔径为 8 mm 的 60 × 1.2 NA 无限校正微分干涉差异（DIC）显微镜物镜（CFI Plan Apo VC 60×WI；Nikon，Melville，New York）。在许多典型的光阱设计中，形成光阱的物镜是倒置显微镜的一部分，可以被修改来使诱捕射束进入（Neuan and Block 2004）。虽然这种系统具有可以预先装备的优点，但它们的使用灵活性差，并且不提供自定义物镜装配方案。在我们的仪器上，诱捕物镜都安装在自行设计的可在三个轴上移动的铁镍合金支架上（561D-XYZ；Newport，Irvine，California），这使得物镜关于射束轴能够精确地置于中心和使其后聚焦平面随控制反射镜变化精确定位。严格地聚焦激光，样品池内的衍射极限斑被安装在相同平面的同一物镜收集（后物镜，图 14-3）并投射到检测平面，下面会讨论。样品池安装在一个自动化（CMA-12CCL；Newport）三轴移动平台（562-XYZ；Newport）上。相对于光阱，样品池位置的全三维控制使单分子实验成分的汇集变得容易得多。

### 视觉系统

实验操作的一个本质方面是能够形成一个样品槽内捕集微珠的可视图像。在我们的设计中，我们利用后物镜不仅仅作为激光的收集透镜，更是作为系统样品平面成像的一个组成部分。这样，我们不仅可以显示样品槽和捕集微珠，也能显示诱捕射束本身。我

们经常利用这一特点来诊断未校准的物镜或样品槽。在经典实验中，用一个滤色片（03FCG411；Melles Griot，Rochester，New York）来移除诱捕光。将来自发出白光的二极管的光聚焦于前物镜的后聚焦平面上，给样品盒提供了 Köhler 照明。物镜侧面的两个分色镜用于反射 IR 诱捕光，通过可见光（03BDS001；Melles Griot 用于 845 nm 系统：NT43-955；Edmund Optics，Barrington，New Jersey，用于 1064 nm 系统）。样品平面通过后物镜和一个额外管透镜（200 mm，双凸镜）成像于一个 CCD 相机（902-C；Watec，Orangeburg，New York）上。图像通过一个图像卡（NI 1407；National Instruments，Austin，Texas）转到电脑中。这种视觉系统可以通过参考例如平面测微器（02214-AB；SPI supplies，West Chester，Pennsylvania）的已知距离来校正。

## 检测平台

高分辨率测量需要两个光阱在相对位置上达到埃数量级以上的稳定性。这还需要能够观察到珠子埃级的运动，从而来检测生物学系统的动力学。目前已有许多技术应用于检测这些运动，且均会随线性、敏感性和速度而变化（Neuman and Block 2004）。一种已用的普通技术，即后聚焦平面干涉测量法（Gittes and Schmidt 1998a；Pralle et al. 1999）达到了高分辨率应用对敏感性和波宽的要求。

这个技术利用了干涉图案的敏感位置依赖性，干涉图产生于由捕获微珠形成的散射光和非离散光之间的物镜后聚焦平面上。通过将这个图成像于一个位置敏感检测器，很有可能检测到其分别反应微珠侧向和轴向运动的质心位置和光线分布的微小变化。与样本平面一个可视图像的 60×～100×放大倍率相比，后聚焦平面干涉测量法能够显著地将微珠的侧向偏振放大几千倍。因此，在许多光电检测器的检测范围内，样本平面一个 1 Å 的微珠位移会导致干涉图质心几百纳米的运动。

在我们的仪器中，两个诱捕射束均运用后聚焦平面干涉测量法，通过将一束偏振射束分离到两个独立的光电检测器上的方法，将后物镜的后聚焦平面以单位放大倍率成像（图 14-3）。因此，检测平面随物镜两个聚焦平面及其可控反射镜的变化而变化。所以反射镜的运动不会导致光电检测器上的射束发生运动。我们使用 10 mm × 10 mm 蜂房式线圈硅光位置敏感检测器（DL100-7PCBA3；Pacific Silicon Detectors，Westlake Village，California），这是因为其背景噪声低（图 14-4）、整个反应区域均为线性反应、内置前置放大器电路，以及对 845 nm 和 1064 nm 的光都有极好的反应时间（Neuman and Block 2004；Huisstede et al. 2006）。一个附加镜使一个平面的图像相对于另一个不是反向的。由于物镜产生的微小扰偏振，我们观察到正交偏振射束之间存在约 2%的交叉干扰。这种置乱也可用因光束之间干扰引起的光阱分离调节光的强度和分布。为了使光阱分离超过 500 nm，我们观察了一个调节信号，等同于与诱捕波长相比振幅约为10 Å 光阱运动的微珠偏振；当光阱分离小于 500 nm 时，这个调制振幅最大值约为 50 Å。因为这个信号随着光阱的分离而缓慢变化，其对分辨率的影响可以忽略不计。最后，我们观察了当微珠捕获少于一个微珠直径距离时偏振信号的偏移，这个偏移是由通过一个光阱捕获微珠来对另一个光阱光的几何剪裁产生的。

与我们的设计中用光镊激光束监测微珠位置不同，有研究组可能引入第二个弱激光来进行检测。附加的操纵这种与捕获微珠无关的检测激光束的能力，为校准、检测范围

的增加（Neuman and Block 2004），以及不管用于捕获的光学势能形状如何均可线性检测提供了直接的方法（Greeleaf et al. 2005）。不过，这种技术的一个缺点就是检测光束必须来自于一个与诱捕激光稍微不同的光学通路传播，使其位置与诱捕光束相对并避免受到上述环境噪声源的干扰，特别是空气的波动。原则上，对空气波动的敏感可以通过使诱捕光束和检测光束的光学通路差异最小化，或将这个光学过程置于低折射率环境中而减小（Abbondanzieri et al. 2005）。

这种双光阱设计除了提供了重要的仪器稳定性和与环境噪声的绝缘，双光阱检测系统还有几个重要的附加优势。其中最主要的是使这个设计与系统的布朗运动显著隔离，这个特点将在下一章中详细讨论。此外，双重检测能够用于去除与两个诱捕光束共有的仪器噪声和漂移。例如，相对于前物镜，导致两个诱捕光束有相同信号的后物镜漂移的影响能够被双重检测去除。同样的，加强一个光阱同时弱化另一个光阱的光束偏振波动，在每个光阱中产生相同信号——使其有相同的刚度，这能被双光阱检测系统去除。

## 数据收集和定标

在测量的时候，我们试验了两个蜂房式线圈光电检测器，并获得与在横向、$x$ 和 $y$ 方向上光的质心位置相成正比的电压，其中两个多余的电压与每个检测器检测的光的总量成正比。此外，我们也监控了与压电镜平行线和垂直线相对称的两个镜应变测量器电压。这 8 个电压信号用一个 M 系列 18 位数据收集记录板（PCI-6289；National Instruments）以 500 kHz 或每个通道 62.5 kHz 的频率收集。假如高频率测量是需要的，数据以其最大的带宽保存到盘上；另外，数据用自定义 Lab View（Lab View 7.1；National Instruments）软件平均到最小带宽，<5 kHz，并保存到盘上。硬件过滤对这些信号来说不需要，因为这个自定义软件以 62.5 kHz 收集我们的数据能够在保存到磁盘上时以实际时间过滤。

这 8 个电压的收集包含了一个标准测量所需要的所有信号。然而，首先反射镜监视器的电压必须转换成为物理上的光阱分离，我们可以用校准录像系统测量两个被俘获微球中心之间的分离来实现这个目的，后者是压力控制反射镜上驱动电压的函数。此外，光电检测器电压必须转变为样本盒中微滴的物理位移和施加到它们的力。两个去除偏振的横向位置电压 $V_{x,y}$ 与通过 $d_{x,y}=\alpha_{x,y}V_{x,y}/S$ 与实际位移 $d_{x,y}$ 相关，$\alpha_{x,y}$ 是光电检测器信号对每个横向方向的受陷微滴实际纳米级运动的转换比率。$V_{x,y}$ 由光电检测器上光的总强度来进行标准化，因为通过电压 $S$ 测量，所以不依赖于 $\alpha_{x,y}$ 光的强度。光力 $F_{x,y}$ 由 $F_{x,y}=\kappa_{x,y}\,d_{x,y}$ 决定，$\kappa_{x,y}$ 是横向光阱刚度。微粒的轴向位移可以通过相似的方式测量，但在多数双光阱应用中是不需要的。

确定 $\alpha_{x,y}$ 和 $\kappa_{x,y}$ 的几个校准技术都依赖于测量捕获微滴对已知振幅的驱动力的反应，这个已经在文献中被广泛地证明（Berg-Sørensen and Flyvbjerg 2004；Neuman and Block 2004）。最常用的，即我们所利用的方法，是通过测量微滴因来自周围溶剂的热驱动力引起的布朗运动。如图 14-4 所示，捕获微滴布朗运动的功率谱有一个特征性的洛伦兹形状。通过装配这个光谱，决定噪声振幅和洛伦兹角频率，我们得到 $\alpha_{x,y}$ 和 $\kappa_{x,y}$。

这个校准方法以极高的精密度（典型的，1%～2%），但极差的准确度（通过一些估计，只有 5%～15%）决定转换因子。其部分原因在于估计微滴的黏滞阻力系数时的

系统误差，$\gamma$，其被假定处于功率谱内[①]。在我们的实验中，来自多数厂家的微粒从指定大小仅仅变化一点点百分比，但是也发现一些批次有10%的偏差（Z. Bryant，pers. comm.）。黏滞性也会随着缓冲液（100 mmol/L NaCl 约1%，100 mmol/L Tris 约3%，以及100mmol/L $MgCl_2$ 约4%）和温度（每开尔文约2%）发生巨大的变化（Lide 2007），导致校准的潜在系统偏差。文献中讨论了几种方法可以尝试用来确定微滴阻力系数（Tolic-Nørrelykke et al. 2006），从而不会因为缓冲液黏滞性或微滴直径而导致系统误差。此外，来自光电检测器电压对样本平面位移 $\alpha_{x,y}$ 的变化能够被直接测量，如通过检测光束（Neuman and Block 2004）或通过其他方法（Vermeulen et al. 2006），使功能谱拟合用于分别决定阻力系数和光阱刚度。另一个参与减少功率谱拟合（power spectrum fit）校准方法的因子是对更高位影响的忽略（Berg-Srenden and Flyvbjerg 2004），导致来自简单洛伦兹形状的测量噪声功能谱的偏差。将这些影响归纳于一个更全面的理论则能显著地提高拟合级别并减少拟合参数的系统偏差。对多数应用来说，洛伦兹光谱拟合提供的准确性是充分的。在特定的高分辨率实验中，位移的绝对度量是需要的，然而这些步骤对保证更高的准确性是必需的。

## 设计准则

我们以指导方针的方式总结了以上关于设计高分辨率光镊和选择其组件的讨论：

1. 在用同一个激光器形成两个光阱使用双光阱光镊。固定DNA系绳的两端在光学上有巨大的好处，这是因为这种几何结构可以极大地减少仪器中来自平台和其他光学组件的机械漂移的振动。此外，用相同的激光器来形成两个光阱使来自激光器中指向波动的影响最小化。
2. 选择一个具有高功率稳定性的激光器。高分辨率的应用要求功率稳定性达到测量所需求的时间尺度的1%以上，一般为百分之几十秒。本章中所描述的两个激光系统为高分辨率提供了合适的功率稳定性。
3. 在应用中选择一个合适的光束控制方法。如果利用合适的接替镜，压电驱动镜和AOD都能提供有埃级以上稳定性的微米级光阱运动；因此，这个结果应该由相关重要因素如操作速度、功率损耗和光阱刚度波动等推动。
4. 将分离后、再结合前的偏振光束的路径长度最小化。减小两个光阱相关位置空气波动的影响来尽可能保证路径的正常。在我们的设计中，并不需要低折射率媒介如氦或局部真空。
5. 利用水浸物镜相对于利用油浸物镜。虽然水浸物镜在形成强光阱方面效率稍微低一点，但是这个劣势远远比不上在同一个样本槽中的捕获深度，使实验进一步远离槽移动的影响的好处。
6. 检测两个捕获微滴的运动。利用偏振后聚焦平面干涉测量法的双光阱检测系统提供了检测两个微滴埃级以下运动所需的敏感性。对两个微滴的检测进一步减少了对后台漂移的敏感性；然而，检测两个微滴更令人关心的因素将在下面进行讨论。

---

① 对于一个球形物体，$\gamma=6\pi\eta a$，式中 $a$ 为这个微球的半径；$\eta$ 为其黏度。

如前所述，环境、元器件以及整体设计都会影响到光阱的空间分辨率。然而即使对这些细节小心在意，引起阱中微球布朗运动的力仍然会极大地限制光阱的空间分辨率。在本节中我们集中讨论实验的设计与操作，如珠粒大小与束缚长度的选择，甚至是珠粒运动的监测方法会极大地影响测量的精度。通过研究布朗运动如何受实验参数和检测方法的影响，我们制定了一套设计高分辨率实验的原则——如何最小化布朗运动的影响从而最大化试验的分辨率。

## 布朗噪声和测量

典型的双光阱实验由分别位于两个光阱中的两个珠粒，以及束缚这两个珠粒伸直长度为 $L$ 的单分子（为了说明的方便我们假定这个单分子为双联的 DNA）所构成。分子的伸直长度改变了 $\Delta L$（如 DNA 操纵蛋白的作用）使珠粒偏离了其初始位置。这些偏移参与到每个光阱以及 DNA 束缚的弹性常数 $\kappa_1$、$\kappa_2$、$\kappa_{DNA}$[①]之间的束缚长度的改变。结果是每个珠粒的偏移总是小于束缚长度的改变。

反映这些变化的能力受到周围水缓冲液的热力学作用力的极大限制，同样的作用力也引起阱中珠粒的布朗运动。在每个时间点，每个珠粒都会受到三个平衡力的作用[②]：光阱的复原力、束缚张力、布朗运动力。想要测量 DNA 的伸直长度，必须知道分子的张力和伸长量。即使是十分完美的仪器，即每个珠粒的即时位置、光阱之间的距离（即分子的伸长量）都可以十分精确地获得，DNA 的张力却不能直接获得，只能通过测量珠粒受到的光阱力来间接获取。因此因为布朗运动力的作用 DNA 张力的测量总包含一定的不确定性。普遍有这样的误解，认为珠粒本身的热力学运动限制了光钳的分辨率。而事实上是即时的束缚张力极大地限制了光钳的空间分辨率。

## 双光阱空间分辨率

关于布朗噪声对于光阱分辨率的影响已有人做了详细的计算（Moffitt et al. 2006）。简而言之，就是测量到的光阱中束缚珠粒受伸直长度改变（$\Delta L$）的作用而产生的偏移量与它们（珠粒）布朗振动偏移与测量带宽之商的比值。这些量的比值——信噪比（SNR）——是仪器空间分辨率的一个度量。对光阱 1 之中的珠粒微球来说，其空间分辨率为[③]

$$\mathrm{SNR}_1 = \frac{\Delta L}{\sqrt{4k_B TB}} \frac{\kappa_2 \kappa_{DNA}}{\sqrt{\gamma_1(\kappa_2 + \kappa_{DNA})^2 + \gamma_2 \kappa_{DNA}^2}} \tag{1}$$

---

① DNA 的刚度被定义为 $\kappa_{DNA}(F_{DNA}, L) \equiv \mathrm{d}F_{DNA}/\mathrm{d}X$，由可延伸的蠕虫状链模型 DNA 弹性可知，其中 DNA 的张力 $F_{DNA}$ 与其延伸 $X$ 有关（Wang et al. 1997）。

② 在长时间类型的测量中，系统惯性和黏滞阻力可以被忽略。

③ 在以下所有的 SNR 中，有一个被忽略的因子 $X/L$，它转化 $\Delta L$ 到相应的延伸改变。这个因子在双链 DNA 最大张力时接近于 1（$F>2$ pN），并通常被忽略。然而，对于较为柔顺的栓系，如单链 DNA，这个因子具有显著的作用。

对光阱 2 可将对应的下标 1、2 互换。其中 $\gamma_{1,2}$表示两个珠粒的阻力系数（drag coefficent）；$T$ 是水缓冲液的温度；$k_B$ 是波尔兹曼常数；$B$ 代表测量带宽。$SNR_1$ 表示只监测两个微球粒之一的位置 $x_1$ 时仪器的空间分辨率。

将上述结果与单光阱系统比较会有有趣的发现（Gittes and Schmidt 1998b；Moffitt et al. 2006）（当 $\kappa_2 \to \infty$时估计 $SNR_1$ 得到）

$$SNR_{single} = \frac{\kappa_{DNA} \Delta L}{\sqrt{4 \kappa_B TB \gamma_1}} \tag{2}$$

$SNR_1$ 与 $SNR_{single}$的尺度与带宽和阻力系数相近。相对的，其中 $SNR_{single}$与 DNA 系绳刚度——$\kappa_{DNA}$呈线性关系，而 $SNR_1$ 可以饱和到牵引系数为 $\gamma_1 + \gamma_2$ 的刚性哑铃的分辨率。因此尽管第二个光阱可以提供额外的隔离，而未加监测的第二个珠粒由于受到布朗运动的影响而降低了双光阱光钳相对于单光阱的分辨率。

## 差分检测

上述方法仅仅监测一个微球的位置，无法充分利用双光阱设计的分辨效率。为了说明这一点，我们假设一个系统，其中被 DNA 束缚的两个相同的微球处于两个具有相同刚度的光阱中。这个系统的波动可以分为两种模式：对称的和不对称的。因为系统对束缚长度改变的反应完全是不对称的，所以只有不对称的噪声限制系统的分辨率。因此通过监测微球位置坐标的差值 $x_ \equiv x_1 - x_2$，所有与监测不相关的噪声都可以被排除掉。$x_$ 的信噪比可简单表示如下：

$$SNR_{opt} = \frac{\kappa_{DNA} \Delta L}{\sqrt{4 \kappa_B TB \gamma_{eff}}} \tag{3}$$

式中，$\gamma_{eff} = \gamma_1 \gamma_2 / (\gamma_1 + \gamma_2)$ 与 $SNR_1$、$SNR_{opt}$不同，不依赖于任意光阱的刚度，与 DNA 的刚度呈线性关系。公式（1）与公式（3）相比，显而易见对于所有参数值来说 $SNR_{opt} \geqslant SNR_1$。在图 14-5B 中 $SNR_{opt}$，$SNR_1$ 作为光阱及束缚刚度的函数来测量直接证明了测量两个微球位置的优势。上面的例子说明采用差分监测微球的双光阱仪器优于只监测单微球的相同的仪器。虽然不是很明显，双光阱的 $SNR_{opt}$尽管多了第二个微球的布朗运动，但还是优于单光阱的 SNR。方程 2，单光阱 $SNR_{single}$的分辨率在形式上与 $SNR_{opt}$极其相似。然而，由于 $SNR_{opt}$的有效牵引系数 $\gamma_{eff}$总是小于每个珠粒单独的牵引系数，故总有 $SNR_{opt} \geqslant SNR_1$。这种改善的内在机制是两个微球整体的不对称运动较单个微球可以更快地耗散环境的热力学能——较小的牵引系数 $\gamma_{eff}$即证明这一点。

通常情况下光阱的刚度和微球的直径并不相同，可以证明（Moffitt et al. 2006）总存在一个微球偏转 $x_{opt} = A_1 x_1 - A_2 x_2$ 的线性组合可最大化空间分辨率，如果 $A_{1,2}$的振幅满足如下条件：

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{\gamma_1 (\kappa_2 + \kappa_{DNA}) + \gamma_2 \kappa_{DNA}}{\gamma_2 (\kappa_1 + \kappa_{DNA}) + \gamma_1 \kappa_{DNA}} \tag{4}$$

当作上述调整，SNR 可以最大化并由公式（3）给出。注意，在相同刚度与相同微球的情形下，振幅相同且有 $x_{opt} = x_$，公式（4）提供了一种对于任意一组实验参数，通过测量微球的位置，最大化双光阱仪器分辨率的方法。有相同光阱微球的系统有最优差值 $x_$ 是个例外，计算最优组合 $x_{opt}$需要知道 $\kappa_{DNA}$，而 $\kappa_{DNA}$的值会在实验过程中随着张力

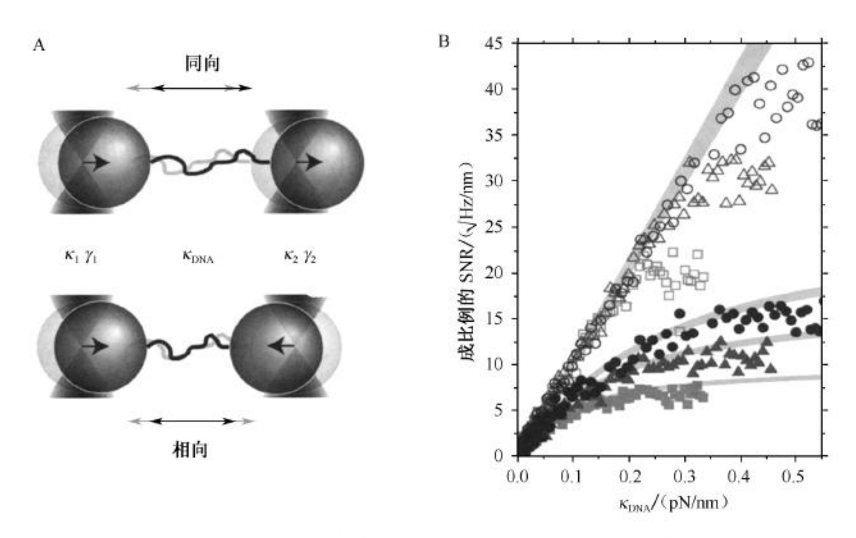



图 14-5 差分检测改善光钳的分辨率。A. 相同微球及光阱的双光阱系统的对称与不对称波动。通过监测两个光阱的位置，不相关的对称运动可以被移除。B. 直接法测量空间分辨率。1 μm 双链 DNA 分子束缚两个 800 nm 直径的处于相同光阱束缚下的珠粒。信噪比是作为束缚刚度的函数来测量的：当光阱分离，约位于 3.5 nm，相对于它们的波动 1 s 的步长并处于 1.25 kHz 的带宽之上，取观测到的珠粒位移的比值。图示为 $SNR_1$（实心标记）、$SNR_{opt}$（空心标记）相对于不同光阱刚度的值（灰色方形，0.13 pN/nm；深灰色三角形，0.22 pN/nm；黑色圆形，0.33 pN/nm）。公式（1）与公式（3）的理论预测值（包括根据一些小的校正而做的修改，Moffitt et al. 2006）如图中处于 1-σ 置信区间的灰色区域所示，表示实验参数的误差。这些预测值跟测量值在一定的范围内很相符——这个范围可以通过提高光阱的刚度来提高。所有 SNR 的测量都采用单位带宽的 1 nm DNA 长度的改变为度量，以便于与其他信号和带宽做比较。

的改变而发生变化。

我们已经描述了双光阱光镊空间分辨率的理论限制、差分检测的优势，并且在图 14-5B 中展示了满足这些限制的可能性。以下我们将深入讨论最优分辨率如何依赖于实验参数，以及依赖于这些实验参数的实际限制。

## 带宽和采样

依赖于带宽的 SNR 的计算满足测量频率 $f = 2B$，远小于光阱中珠粒的自然弛豫频率（通常在 kHz 的范围内）（Moffitt ea al. 2006）。这一频率之下，珠粒的运动基本与此无关，导致在 SMR 中以 $B^{1/2}$ 为定标。所以测量的带宽必须在试验允许的动态范围之内。避免测量带宽混进高频部分的额外噪声，有必要在高频下监测系统且平均到想要得到的带宽，或者对原始信号硬件滤波，采样想要的频率，通常是滤波频率的 3-dB。

采样通道和同步同样重要。改善差分检测的分辨率依赖于微球由于之间的束缚而运动的“即时同步”。由于这种同步衰减极快，所以通道之间的衰减会降低仪器的分辨率。实际应用中，如果每个电压通道有专用的模数转换器（ADC）的话，每个位置感应光

子检测的同步采样是可行的。然而，许多获取电流数据的系统（只有一个 ADC 和很小的延迟）都可以多通道采样。在我们的仪器中，我们对与运动同轴的通道进行采样，使这些通道的采样衰减只有 2 μs，大概比相关衰减的时间快了 50～100 倍。

## 珠粒大小

尽管根据均分理论（equipartition theorem），所有未过滤的布朗噪声与珠粒大小无关（Moffitt et al. 2006），$SNR_{opt}$以 $\gamma_{Reff}^{-1/2}$ 的尺度来衡量，因为小的珠粒较大的珠粒振动快，且波动小于测量带宽。因此使用较小珠粒的实验有更高的分辨率。除了潜在的最适检测调整的简化，使用相同大小的珠粒别无裨益。如果由于实验的需要某一珠粒唯一给定的大小，让另一珠粒尽可能地小是有好处的。另外使光阱的刚度满足条件：$\kappa_1/\kappa_2 = \gamma_1/\gamma_2$ 可简化最优调整，公式（4）中的 $x_{opt}$ 为差值 $x_-$。

尽管减小珠粒的长度大有裨益，可是珠粒的大小有实际的限制。首先，产生给定刚度的激光的功率随珠粒的大小而改变（Rohrbach 2005），在接近水中的束缚波长时有一最小值，这一直径之下急剧增加。其次，后聚焦面（back focal plane）的干涉测量也与珠粒的尺度有关，同样也会在接近束缚光在水中的波长时有一峰值（Y. Chemla and J. Moffitt 未发表）。最后，当珠粒的大小超过光阱的大小时，我们发现操纵珠粒使之在样品池里形成束缚将变得极其困难。在测量中，我们通常采用 800 nm 的珠粒，这样可以较好地协调分辨率的改善与其他实际问题之间的关系。

## 系绳刚度

相对于对测量带宽和珠粒的依赖性，$SNR_{opt}$与系绳刚度呈线性关系，使 $\kappa_{DNA}$ 成为改善测量分辨率的最有效因素。从物理角度来说，这种增加是因为刚性束缚较顺应性束缚可以更好地将长度改变传导给珠粒，还因为珠粒的运动与刚性束缚的相关性更好（Moffitt et al. 2006）。因为 DNA 的刚度随着伸展长度的改变而相反的改变，所以短束缚更具优势。然而珠粒由较短的分子束缚时，珠粒间的距离也随之变短，由于束缚光束的剪切、干涉而导致的信号偏差，如前所述，会引起力的测量不准确。此外，当束缚长度变短，与束缚方向垂直的方向上的布朗运动以及微球的转动会增加其对空间分辨率的影响（Moffitt et al. 2006）。为了最小化这些影响，我们通常采用双链 DNA 束缚——300 nm，或者更长。

对于 DNA 束缚来说，刚度也依赖于张力——在 0～20 pN 的范围内增长迅速，然后缓慢饱和于一个等于 DNA 拉伸模量除以其长度（stretch modulus）的常量（Wang et al. 1997）。通常测量中力的范围受所研究的生物学系统的限制，因其对张力极度敏感。一般的是根据所测量系统的生物学限制选择一个测量力的范围是有必要的，然后采用其他方法最优化这些力的分辨率。

## 光阱刚度

最优分辨率，$SNR_{opt}$，不依赖于任意光阱的刚度这一点十分重要。通常会采用力学反馈的方式来操作光镊——移动一个光阱使其中一个微球受到一个恒定的光力的作用（Neuman and Block 2004）。由于多种原因这个方法十分有效，最重要的原因之一是使

用者可以在不需要知道系绳顺应性和张力的情形下测量系绳长度的改变。因为力是一个微球位移的常数，一台具有理想力学反馈系统的仪器的有效刚度为零。因为 $SNR_{opt}$ 与光阱的刚度无关，故理想力学反馈的系统与光阱距离为常量的系统并无差别。此外重要的是实际上非理想化的力学反馈系统会引入额外的噪声。

尽管光阱刚度对于布朗运动影响仪器的分辨率的程度没什么影响，但其在达到有效的分辨率中仍有重要的应用。因为束缚长度的改变分布于光阱与 DNA 顺应性之中，所以测量的微球的位移随着光阱刚度的增加而降低。这种效应增加了其他噪声源的相对重要性，如光子监测器背景噪声（图 14-4）。此外，受力作用的和来自后聚焦面的干涉测量的信号与珠粒位移呈线性关系的区域通常仅有约 100 nm（Greenleaf et al. 2005）。增加光阱的刚度可以增加所施加的张力，同时保持力与位置的线性检测。通常对于 869 nm的珠粒，我们操控光阱的刚度的范围在 0.1～0.4 pN/nm。这个范围足够低，使仪器的噪声小于获得的信号；也足够高，可以在光阱的线性范围内施加适当的张力。

除了当微球放置于距离光阱中心很远的位置引起的检测中的非线性，我们发现了额外的噪声，这些噪声是由将轴向波动耦合到侧向运动检测时产生的，如图 14-6A 所示。增加光阱的刚度可以增加张力，但是不能明显改变当这些额外的波动出现时引起的微球的偏转（图 14-6B 和图中插图）。尽管预计从后焦平面干扰的理论模型理解（Pralle et al. 1999），这样的影响也可以按照几何概念理解。当微球从侧向被拉得远离光阱时，

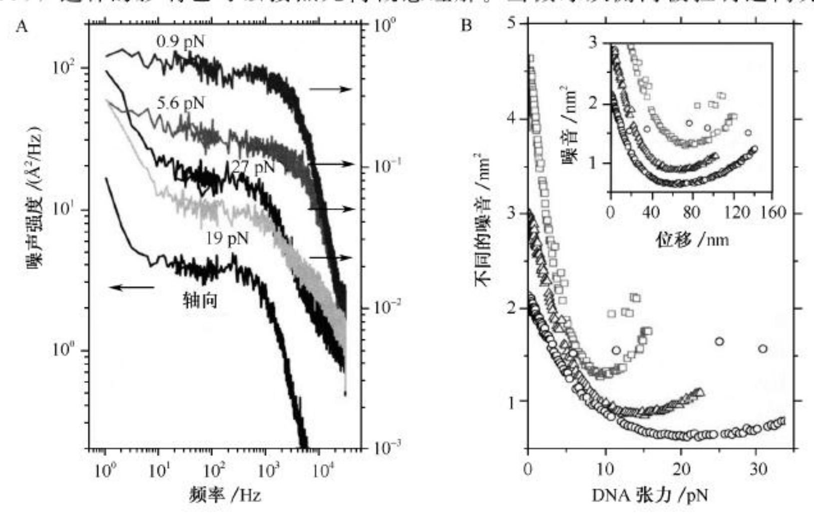



图 14-6　耦合轴向波动到侧向检测。A. 侧向噪声功率谱中的轴向波动。显示的是两个栓系珠子在光阱约 0.25 pN/nm 中不同波动的能量谱（上面的曲线，左轴）。在较小的张力，观察到的频谱与期望的波动较好的一致，随着张力的增加而减小，然而，在较高的张力，额外的波动在约 1 kHz 处显示出显著的上翘，这额外的噪声频谱很好的与轴向方向检测到的波动保持一致（下面的曲线，右轴）。B. 在 1.25 kHz 带宽时的差别噪声作为张力函数。随着张力的增加的噪声代表轴向噪声耦合的发生，在这个起始的发生的力量强烈依靠光阱的刚度（灰色方块，0.13 pN/nm；黑色圆圈，0.33 pN/nm），而不是珠子距光阱中心的位移（插图），孤立点代表来自我们栓系中的离散动力学的外部噪声。

一些向前分散的最高 NA 的光射线被后物镜孔径截断，或者由于全反射而丢失在样品池内。微球在轴向的任何运动将改变被截断的光线的量，并且将变换后焦平面上发散光干涉图样的质心。结果，轴向运动通过位置敏感检测器被测量成为侧向信号。这样的额外噪声将限制分辨率，如图 14-5B 所示。增加光阱的刚度以便能够将理想的张力实价到光阱线性范围内，从而可以绕开这些问题。前后物镜之间相对角度轻微的不校准，能够加剧发散光线不对称截断的程度。因而，小心校正能够极大地增加忽略这些影响的范围（见下文，校正方案）。

### 分辨率优化方案

以上面的原则为基础，我们提供了一整套使布朗噪声的影响最小化的方针。

1. 用光学坐标 $x_{opt}$ 监测两个微球的位置。正如公式（4）中的定义，微球位置的线性组合将使设备的分辨率达到最大化。对于具有统一光阱刚度和微球直径的对称系统，$x_{opt}$ 只不过是不同的 $x_$ ，可以增加益处而不依赖系统参数。
2. 样本数据同步化并尽可能地平均到最小带宽。越小的带宽可以平均越多的波动，从而导致高分辨率。另外，在收集珠子位置信号时小的时间延迟可以保持相关性从而能够优化分辨率。
3. 尽可能用最小的微球。分辨率随着微球大小的减小而增加。如果受到某些实验的限制，一个微球必须有固定的大小，另外一个应该更小以便去最大化分辨率（除了一个简单的光学坐标的便利，没有任何益处使两个微球大小一样）。
4. 使系绳刚度最大化。分辨率与系绳刚度成线性比例，可以通过减小系绳长度或者增加张力来增加分辨率。实际上，由于生物系统对力的敏感性，系绳张力特别地被限定时，系绳太短将导致测量错误和额外的波动。
5. 选择光阱刚度使得施加的力能落在光阱的线性范围内。弱光阱将导致额外的噪声，这些噪声起因于较弱力将轴向波动耦合到侧向信号。然而，超强的光阱也是要避免的，因为它们将增加系统噪声源的相对重要性。

## 总结和展望

在本章中，我们提供给读者一整套搭建高分辨率设备的基本指导方案。我们的设计，具有差分检测的双光阱光镊，是这些原则的实际应用。通过用来自同一激光的光形成两个光阱，并使这两个光阱珠子的共同光通路最大化，我们将设备与许多来自环境和设备的噪声分解开来，这些噪声特异地限制空间分辨率。另外，通过检测两个光阱微球的位置，我们可以排除两个光阱共同的漂移和噪声，更重要的是，消除与有用信号分辨率没有直接关系的布朗波动。通过这些技术，我们能够检测系绳 1 bp 光阱珠子的 DNA 分子的长度变化（图 14-1B）。

公式（4）中的最优 SNR 比率表示了双光阱系统的空间分辨率的理论极限。尽管我们很好地证明了测量分辨率和这个理论的一致性（Moffitt et al. 2006），但是实际中我们的测量方法仍然受限于我们在非常低频率观察时出现的不相干的噪声（图 14-6A）。这些噪声的来源仍不清楚，但是它们的消除对于这个设备空间分辨率的提升至关重要。

一个可能是，这些噪声并不是来源于设备，而是来源于微球和系绳本身（Abbondanzieri et al. 2005；Moffitt et al. 2006）。以测量 DNA 系绳的微球的波动为基础，我们推测珠子的非理想性或者过多的 DNA 分子附着到这些珠子能够导致额外的噪声；另外，可能埃级别的系绳 DNA 的运动或者 DNA 与珠子的接合处都参与形成我们实验中的环境噪声。这些噪声的特点将持续成为研究领域中的活跃部分。

过去 20 年中这个方法所取得的技术进步并不缺少惊人之处。现在新一代的光镊可以得到前所未有的稳定性和分辨率，并且没有理由认为在这一年来不会有进一步的改进。正如单分子技术的发展带来了对于许多基础生物过程的深入了解，这些新的高分辨率的设备也能够极大地增加我们更详细和精确地确定这些系统特点的能力。

## 校正方案

高分辨率设备的性能，如形成强光阱、最小化来自光阱运动的噪声，或者环节轴向耦合，能够通过小心校正得到极大的提升。这个过程起自激光并且一个组件一个组件地推进整个设备。当俘获光在 NIR 光谱内时说明校正已经完成。标准红外观察卡通常被用来定位光束，但遗憾的是漂白太快。作为替代，我们使用装配有 C-固定摄远镜头的 IR-观察 CCD 摄像机（902-C；Watec，Orangeburg，New York），并将影响呈现在监视器上。通过使在一对相距 12 in 同等高度的光圈上分散光的可视化，光束的方向可以被设置得沿固定轴向非常精确。

## 实验方案 1：光束束腰和光束准直

正如文中所描述的，光束准直和光束束腰在两个光镜的定位中是很关键的（T1 和 T2，图 14-3）。尽管通常通过剪力板比较不同位置的光束的大小可以准直光束，但是还有一个简单的替代方法就是通过一个长距离来反射光得到准直。由于即使相当低的激光强度也是饱和的，光束束腰并不能通过 IR 卡准确地测得。一个比较准确的方法是去测量经过不同孔径 $d$ 后到达光圈的光的强度 $P(d)$，并且适用于这样的方程：$P(d)/P(\infty)=1-\exp(-d^2/2\omega_0^2)$，在这里 $2\omega_0$ 指的是高斯光束直径。为了准确适用，光线必须进入光圈的中心而且光子检测器处在光束的中轴线。

## 实验方案 2：可控光束

当两个俘获束的空间间隔最小的时候，空气波动带来的影响将被减小。结果，在第二个分光棱镜转向阶段，将它们尽可能重组为同一轴向是很关键的（BS3，图 14-3）。这也保证了在取样平面光阱一个挨着一个地形成。正如上面那样，我们通过在两个光圈中的分散光来完成定位。同时增加两个光圈之间的距离达到 4 m 以内，我们可以提高这项技术的准确性，并且常规可以较好地定准这些光束同一轴向到 100 μrad 以内，将两个光阱在同一取样平面上重叠的误差只有不到 0.3 μm。

另外，第二个镜必须校准，以便镜平面能共轭到前面物体的后焦平面［找到一个物体的后焦平面，可以咨询供应商或者使用 Smith 等（2003）描述的方法］。从基础光学方面我们可以得知，一个光镜由两个焦距分别为 $f_1$ 和 $f_2$ 的透镜组成，这两个透镜距离为 $f_1+f_2$，形成一个离第一个透镜 $d_1$，距离为 $d_2=M(f_1+f_2-Md_1)$的共轭平面，在这里 $M=f_2/f_1$ 是这个镜的放大倍数。这个方程适合于找到共轭平面的近似位点。然而，通过摆动镜子，并观察俘获束在位置敏感光子检测器上的位移，可以更准确的定位。观察到的信号的最小位移可以标记共轭平面。

## 实验方案 3：物镜

小心对准两个物镜（FO 和 BO，图 14-3）对于高分辨率的设备很关键。例如，一个物镜相对于另外一个轻微的不对准，都可以严重增大耦合到测量中的轴向噪声（图 14-6）。每一个物镜都必须通过将它的轴与入射俘获束平行来校准，并且光束位于它后孔的中心。我们通过肉眼观察两个光圈上的 NIR 光来校准物镜：一个集中在光束，另外一个在我们定制的物镜支架上，集中于物镜的轴。校准过程包含以下几个步骤。

1. 校准前物镜中的角度。我们用一道狭窄光束（通常来自俘获激光本身）通过物镜的中心，将物镜光圈关闭接近最小孔径。然后我们肉眼观察从前物镜通过到达光圈的高发散光，调整物镜上转移阶段三个轴的角度，直到光线可以进入光圈的中心。
2. 在后物镜重复上述步骤。必须在前物镜被移走的情况下完成后物镜的校准。然而，移走和重新放置前物镜并不会严重影响后物镜的校准。
3. 将前物镜对准光轴的中心。我们肉眼观察物镜光圈上的散在的光线——打开光圈去匹配俘获束束腰，并横向调整前物镜直到光线处于光圈的中心。
4. 将后物镜相对于前物镜居中。用水将后物镜和前物镜之间隔开，我们调整在轴向的向后平移阶段，直到被后物镜收集的光线被校准，并且在横向方向光线汇聚到光圈的中心。
5. 步骤 4 的替代方案。一个更加灵敏的方法是将由后物镜收集的光线成像于可视系统 CCD 摄像机（适合于无限大校正物镜，管镜头放置于距离摄像头一个焦距的位置和距离后物镜任何理想位置）。通过将后物镜轻轻地散焦，将出现由于光线通过物镜之间的球面像差引起的同心条纹。关闭光圈孔同样可以产生相似的衍射模式；通过调整后物镜的横向位置去聚集这两种模式，我们可以非常准确地校准物镜。

## 实验方案 4：样品池

样品池相对于物镜未校准会严重影响光阱的性能。另外，光线通过水-玻璃界面时产生的球面像差将导致较为松散的焦点，这样就降低了光阱性能。水浸物镜包含可调整镜头可以补偿像差，从而根据样品池中盖玻片的厚度来调整物镜的校正环是很关键的(1 号盖玻片，VWR Scientific，Brisbane，California)。应该注意的是有一些盖玻片并不平，因此并不是所有的像差都可以通过校准被消除，很有必要通过眼睛去检查并挑选最平的盖玻片。样品池与每个物镜分别校准，细节如下。

1. 安装样品池并形成视觉影像。我们首先通过轴向移动前物镜来分离物镜，然后再靠近后物镜的位置放置一个充满水的样品池。在此配置中，前物镜仍然为后物镜呈现样品池提供充足的照明。通过相对于后物镜轴向的移动样品池，我们可以在 CCD 摄像机上形成样品池影像。
2. 成像光束并调整样品池。我们通过形成俘获束的聚焦图像来中心定位前物镜。样品池任何相对于物镜轴的倾斜或者旋转都会导致聚焦时捕获光的失真。这些失真可以通过调整样品池直到光束图像失真最小而得到校正。
3. 调整前物镜上的校正环。利用图像光束作为参考，我们可以调整校正环，直到由球面像差引起的同心波纹最小。我们发现位于后物镜上的校正环对于检测系统影响很小。
4. 步骤 3 的替代方案。通过调整前物镜使捕获粒子刚度最大化可以将前物镜校正环设置得更精确。

## 实验方案 5：检测平台

在我们的系统中，后物镜的后焦平面以单位放大率成像于两个位置敏感的光子检测器上。因此，具有焦距为 $f$（图 14-3 中 RL1 和 RL2）的成像透镜必须放置于距离后焦平面 $2f$ 的位置，并且检测器必须放置于距离透镜相等的距离。当用第二个透镜校正共轭平面时，我们用这个距离大致去校正透镜和光子检测器，然后调整它们的位置，以便能将镜像振荡时在检测器上观察到的信号最小化。通过用非偏振分光镜替换偏振分光镜，可以准确地校正两个共轭到后焦平面的光子检测器。

## 致谢

我们感谢 J. Choy，S. W. Grill 以及 S. B. Smith 为我们提供的关于设备的建议；感谢 O. Levy、W. Cheng、E. A. Galburt 以及 A. Edelstein 为我们提供的实验元件；感谢 C. L. Hetherington、W. Cheng 以及 Y. L. Zhang 对于草稿的批评性阅读。J. R. M 提供的国家科学基金中的研究生研究奖学金以及 Y. R. C，Burroughs Welcome 基金在科学界面拨款中的职业奖金。

### 参考文献

Abbondanzieri E.A., Greenleaf W.J., Shaevitz J.W., Landick R., and Block S.M. 2005. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438:** 460–465.

Ashkin A. 1970. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24:** 156–159.

Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., and Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11:** 288–290.

Berg-Sørensen K. and Flyvbjerg H. 2004. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 594–612.

Bustamante C., Bryant Z., and Smith S.B. 2003. Ten years of tension: Single-molecule DNA mechanics. *Nature* **421:** 423–427.

Bustamante C., Smith S.B., Liphardt J., and Smith D. 2000. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10:** 279–285.

Gittes F. and Schmidt C.F. 1998a. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Opt. Lett.* **23:** 7–9.

———. 1998b. Thermal noise limitations on micromechanical experiments. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **27:** 75–81.

Gordon C.G. 1992. Generic criteria for vibration-sensitive equipment. *Proc. SPIE* **1619:** 71–85.

Greenleaf W.J., Woodside M.T., Abbondanzieri E.A., and Block S.M. 2005. Passive all-optical force clamp for high-resolution laser trapping. *Phys. Rev. Lett.* **95:** 208102.

Huisstede J.H., van Rooijen B.D., van der Werf K.O., Bennink M.L., and Subramaniam V. 2006. Dependence of silicon position-detector bandwidth on wavelength, power, and bias. *Opt. Lett.* **31:** 610–612.

Lang M.J. and Block S.M. 2003. Resource letter: LBOT-1: Laser-based optical tweezers. *Am. J. Phys.* **71:** 201–215.

Lide D., ed. 2007. *CRC handbook of chemistry and physics.* Taylor and Francis, Boca Raton, Florida.

Mehta A.D., Rief M., and Spudich J.A. 1999. Biomechanics, one molecule at a time. *J. Biol. Chem.* **274:** 14517–14520.

Moffitt J.R., Chemla Y.R., Izhaky D., and Bustamante C. 2006. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 9006–9011.

Neuman K.C. and Block S.M. 2004. Optical trapping. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 2787–2809.

Nugent-Glandorf L. and Perkins T.T. 2004. Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection. *Opt. Lett.* **29:** 2611–2613.

Pralle A., Prummer M., Florin E.L., Stelzer E.H.K., and Hörber J.K.H. 1999. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microsc. Res. Tech.* **44:** 378–386.

Rohrbach A. 2005. Stiffness of optical traps: Quantitative agreement between experiment and electromagnetic theory. *Phys. Rev. Lett.* **95:** 168102.

Settles G.S. 2001. *Schlieren and shadowgraph techniques.* Springer-Verlag, New York.

Shaevitz J.W., Abbondanzieri E.A., Landick R., and Block S.M. 2003. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature* **426:** 684–687.

Smith S.B., Cui Y., and Bustamante C. 2003. Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum. *Methods Enzymol.* **361:** 134–162.

Tolić-Nørrelykke S.F., Schäffer E., Howard J., Pavone F.S., Jülicher F., and Flyvbjerg H. 2006. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Rev. Sci. Instrum.* **77:** 103101.1–103101.11.

Vermeulen K.C., van Mameren J., Stienen G.J.M., Peterman E.J.G., Wuite G.J.L., and Schmidt C.F. 2006. Calibrating bead displacements in optical tweezers using acousto-optic deflectors. *Rev. Sci. Instrum.* **77:** 013704.1–013704.6.

Wang M.D., Yin H., Landick R., Gelles J., and Block S.M. 1997. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.* **72:** 1335–1346.

Williams M.C. and Rouzina I. 2002. Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12:** 330–336.

Wuite G.J., Davenport R.J., Rappaport A., and Bustamante C. 2000. An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophys. J.* **79:** 1155–1167.

（刘富鑫　译）

# 第 15 章　肌动球蛋白马达的成像和纳米操纵技术

So Nishikawa[*]　Tomotaka Komori[†]　Takayuki Ariga[†]　Takuya Okada[†]
Masatoshi Morimatsu[†]　Yoshiharu Ishii[*]　Toshio Yanagida[*†]

[*] Formation of Soft Nanomachines, CREST, JST 1-3, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; [†] Laboratories for Nanobiology (Soft Biosystem Group), Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University 1-3, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

## 摘要

肌球蛋白与多种形式的细胞运动相关。近年来已建立了基于荧光成像和可视化操纵的单分子检测技术并用于肌球蛋白运动的研究。本章我们将介绍两种成像和操纵合用的检测技术，并提供了一组与单分子肌球蛋白研究具体方法相关的实验方案。

## 概述

肌球蛋白是基于肌动蛋白的分子马达，它能把 APT 水解所释放的化学能转化为机械功，以完成肌肉收缩及其他形式的细胞运动。近年来建立的单分子检测技术使得我们能在单分子水平检测其基本的机械和化学过程。单分子检测技术的基础是荧光成像和操纵技术，它们均被用于肌球蛋白运动的研究。采用全内反射显微镜（TIRFM）的单分子成像能使单个马达分子内的运动和化学反应成为“看得见”的过程（Funatsu et al. 1995; Vale et al. 1996）。已经建立操纵单个肌动蛋白丝的相关技术（KishinoYanagida 1998; Ishijima et al. 1991）用于测量单分子肌动球蛋白马达的机械特征（Finer et al. 1994; Ishijima et al. 1994）。荧光成像和操纵技术两种方法的联合使用大大促进了单分子的检测。在单分子研究实验中，同步测量几个参数会使这些参数直接相关（Ishijima et al. 1998）。当对单分子肌球蛋白成像使其可见的同时，又能操纵，这样会使测量更加准确（Kitamura et al. 1999，2005）。本章将介绍两种联合使用成像和操纵的技术。分子运动和 ATP 水解的同步观察就能直接确定肌球蛋白的机械-化学的偶联，而肌球蛋白的单分子操纵就能对肌球蛋白的步移进行高分辨率的测量。

## ATP 分子水解和单个肌动球蛋白马达机械运动的同步观察

成像和操纵的联用技术使直接确定 ATP 水解与机械运动之间的偶联成为可能（图 15-1）。应用单分子成像技术，在固定于玻片表面的肌球蛋白上，可以测出经荧光素标记的单个 ATP 分子的更替。当荧光标记的 ATP 结合到肌球蛋白上时，就会出现荧光光点；当 ATP 水解后 ADP 解离出来时，荧光光点就会消失（Funatsu et al. 1995）。通过肌动蛋白丝两端分别固定于两个激光捕获的微珠的办法，可以检测单个肌球蛋白分子

引起的全步长运动（Finer et al. 1994）。测量 ATP 由肌球蛋白上更替时同步测量而导致的肌动蛋白丝的位移（Ishijima et al. 1994）。

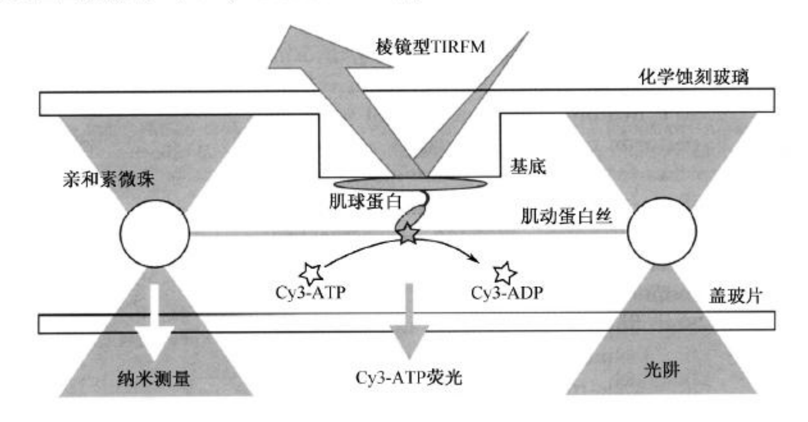



图 15-1　同步测量的实验设计。棒状肌球蛋白丝上的单头肌球蛋白被固定于玻片基座上，肌动蛋白丝两端分别附着于微珠上，光阱通过两个微珠来操控肌动蛋白丝使之以正确的排列顺序与肌球蛋白的头部相互作用。在绿色激光下采用 TIR-FM，通过检测与肌球蛋白头结合时的 Cy3-ATP 荧光及与肌球蛋白头解离时的 Cy3-ADP 荧光，就可以测量出 ATP 的更替。肌球蛋白的位移则可以通过跟踪其中一个微珠的位置变化来测量。

## 仪器

### 成像和光子计数

倒置显微镜（TE2000，日本 Nikon）及其他光学器件（图 15-2）放置于防振台（TDI-189LA，日本 Heltz）上，室内要求隔音和空调保证尽可能低的振动和热漂移。通过三轴操纵器（MP-285，Sutter Instrument）操作样品台。物镜（60× PlanApo TIRF 油镜，数值孔径［NA］=1.45，日本 Nikon）和三轴操纵器固定于 $z$ 轴高度稳定的操作台上（KS-N 型，日本 Nikon）。所有光路均封闭在塑料盒内，以免漏光和空气波动的影响。

氦-氖激光器（He-Ne，05-LHP-925，Melles Griot；λ=632.8 nm）用于激发 Cy5，后者标记于棒状肌球蛋白-肌球蛋白丝和肌动蛋白丝。倍频钕：钇铝石榴石（Nd：YAG）激光器（Compass315M-100，相干式；λ=532 nm）用于激发交联于 ATP 的 Cy3。通过凹凸透镜的组合，如图 15-2 中 LBE1 和 LBE2 分别用于 Nd：YAG 绿色激光器及 He-Ne 激光器，这两种激光器的激光分别被扩束 6.7 倍和 5.3 倍。接着，这些激光束通过一个半波长（λ/2）波片来旋转偏振光的方向及改变 p 波与 s 波的比值，这两种波通过宽带偏振分光器（PBS1）分离得到。通过 PBS1 的 p 波光束进入落射荧光显微镜，而经 PBS1 反射的 s 波光束则通过全内反射荧光显微镜成像。p 波光束透过中灰滤光器（ND1）并经一个凸镜（L1，$f$ = 45 mm）聚焦于物镜的后聚焦面。最后该光束通过分色镜（Cy3 用 D1，FF562-Di01；Cy5 用 FF660-Di01；Semrock）导入物镜。

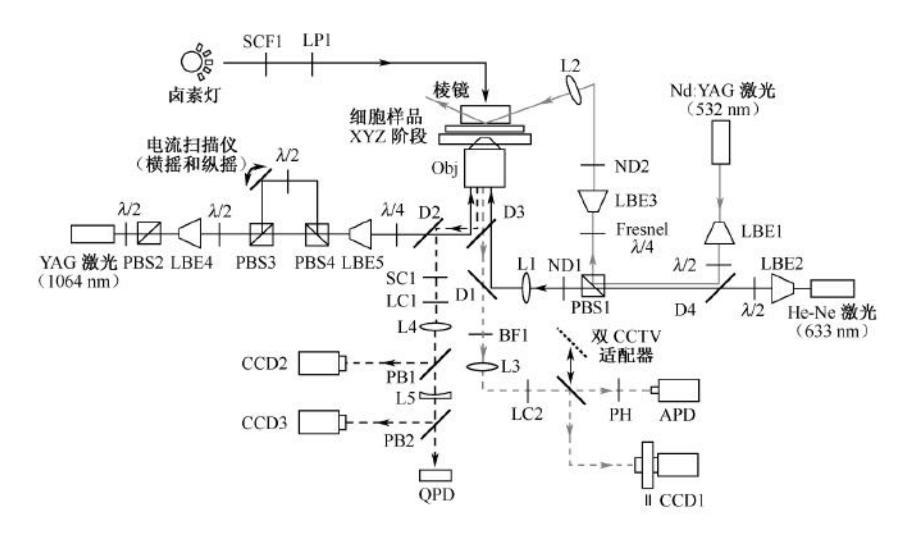



图 15-2 同步测量的实验装置图示。APD 为雪崩光电二极管；LBE 为激光扩束器；BF 为屏障滤光器；BP 为带通滤光器；CCD 为电荷耦合器件摄像机；D 为分色镜；II 为图像增强器；L 为透镜；LC 为 long-cut 滤光片；LP 为长通滤光器；ND 为中灰滤光器；Obj 为物镜；PB 为薄膜分光器；PBS 为偏振分光器；PH 为针孔；QPD 为象限光电二极管检测器；SCF 为超冷滤光器。

采用棱镜型 TIRFM 观察单分子 Cy3 单核苷酸（ATP 或 ADP）。经 PBS1 反射的 s 波光束通过 Fresnel 1/4 波片转化成圆偏振光束，然后通过激光扩束器和中灰滤光器（LBE3 和 ND2）。光束通过熔凝石英立方棱镜（宽 20 mm，深 50 mm）聚焦于硅芯片上。该芯片表面刻有条纹状纵向基架（见实验方案 1），调整位置使之与入射光束平行。棱镜与芯片之间的缝隙用荧光显微镜纯级的甘油填充之。在石英-溶液界面，入射角为 75°至正常，而玻片和水之间的临界角为 66°。标本玻片上的照明区通过一个凸镜（L2，$f$ = 80 mm）调节为 40 μm× 160 μm，这比显微镜的视野略大些。标本平面的功率用半波长板和中灰滤光器调节到 2 mW。这些参数的设置是为了尽可能减小荧光染料的漂白率，并可靠地检测来自单分子的荧光点。基架边缘的散射很小，足以通过中灰滤光器和屏障滤光器观察单分子荧光。用于光镊纳米操纵的远红外光可以通过 750 nm 的长波截止滤光器和屏障滤光器（LC2，SVX750，Asashi Spectra；Cy3 用 BFI，FF562-Em02；Cy5 用 FF660-Em02；Semrock）排除。用显微镜筒透镜（L3，$f$ = 200 nm）将荧光图像聚焦于检测器上。

通过电荷耦合器件摄像机（CCD1，MC681SPD-R0B0，Texas Instrument）获取肌球蛋白和肌动蛋白的荧光图像，偶联于图像增强器（II；C8600，Hamamatsu Photonics，Japan）并储存于图像采集卡（IMAQ PCI-1409，National Instruments，Austin，Texas）。以 33.3 ms 间隔获取荧光图像（视频码率）。采用 LabVIEW 用户软件（National Instruments，Austin，Texas），从实时成像中获取 1 μm × 1 μm 区域内时间依赖的荧光强度，在该区域内存在单分子肌球蛋白并具有 Cy3-ATP 的结合。用雪崩光电二极管（APD，SPCM-AQR-16，Perkin Elmer optoelectronics）取代 CCD 摄像机以提

高采样速度及对荧光强度进行定量分析。进入 II、CCD 和 APD 的光路可以通过多幅图像运算模块（Multi Image Module，MEBI5900，日本 Nikon）进行切换。通过一个置于显微镜筒透镜（L3，$f=200$ mm）焦点处的针孔（PH1；直径 100 μm，日本 Sigma Koki）采集来自 1.5 μm 直径大小标本区域的荧光。针孔的应用同时也可以减小背景噪声。通过 F-V 转换器（BC201，日本 Seentech）每 2 ms 将光子数转换为电压，并将输出信号用数码数据记录器（PowerLab/8SP，Adinstruments）以 24 kHz 的采样速率记录于电脑。

**光阱和纳米测量**

双光阱是通过红外 YAG 激光器（T10-8S，Spectraphysics，California；$\lambda=1064$ nm）产生的。红外 YAG 激光束通过 λ/2 波片后，p 波通过偏振分光器（PBS2），而反射的 s 波则由光束扩散器散射。λ/2 波片和 PBS2 起了光衰减器的作用，调节了远红外 YAG 激光器的功率。随后，激光被扩束 3 倍（LBE4），并通过偏振分光器（PBS3）分成两股独立的光束。两束光的功率比值采用 λ/2 波片进行调节。经 PBS3 反射的光束的倾斜角度通过两个正交的检流计扫描器来调节（Model 6210，Galvanometer optical scannes，Cambridge Technology，Inc.），以实现标本面焦斑的侧位控制。两股光束通过偏振分光器（PBS4）再次被导向沿着同轴前行。汇合的光束合用两个平凸镜（LBE5）扩束 3 倍并使之通过 1/4 波片。之后，两束光通过一个具有 950 nm 波长分离的分色镜（D2，Asahi Spectra Co.，Lid.，日本），后经过一个具有 750 nm 波长分离的分色镜（D3，Asahi Spectra Co.，Lid.，日本）导入物镜。

微珠位移的纳米精度的测量按以下方法完成。微珠用来源于卤素灯并经 780 nm 长通滤光器和 1050 nm 超冷滤光器过滤的红外光照射（LP1 和 SCF1，Asahi Spectra Co.，Lid.，日本）。传导到微珠的红外光通过分色器（D3 和 D2）导入象限光电二极管检测器（QPD）。来自可见光激光和远红外 YAG 激光经 750 nm short-cut 和 950 nm long-cut 滤光器（SC1，LC1，Asahi Spectra Co.，Lid.，日本）滤光。微珠成像透过显微镜筒透镜（L4，$f=200$ mm），随后 8% 的成像经薄膜分光器（图 15-2 中的 PB1；BP108，R/T Ratio：8/92 for 400～2400 nm，Thorlab）反射并投射于 CCD（CCD2，WAT-525EX，WatecCo.，Ltd.）。其余 92%成像通过凹透镜（L5，$f=-20$ mm）放大 8.3 倍并导入薄膜分光器（PB2）。透过的成像被投射到 QPD（S994-13，Hamamatsu Photonics）的中心。象限光电二极管的差异输出经一个定做的差异放大器放大（OP711A，Sentech，日本），并用电脑数字数据记录器记录。反射的成像用 CCD（CCD3，TM-524N，Takenaka，日本）采集以监控 QPD 上的投射成像。

## 同步测量

**力的测量**

采用配有 He-Ne 激光器和与图像增强器偶联的 CCD 摄像机的落射荧光显微镜，可以观察 Cy5 荧光标记的单分子肌动蛋白丝和棒状肌球蛋白-肌球蛋白丝，后者由单头肌球蛋白和棒状肌球蛋白组成。单分子肌动蛋白丝约 15 μm 长，两端分别通过生物素-亲和素系统附着于微珠上，并通过双光阱捕获悬浮于溶液中。紧紧悬吊的肌动蛋白丝与棒状肌球蛋白-肌球蛋白丝上的一个单分子单头肌球蛋白接触，肌球蛋白丝结合于载玻片

矩形基架上（宽约 7 μm，高约 1 μm）。因单分子肌球蛋白头部引起的力和位移可以通过纳米尺度精确测量肌球蛋白头部的位移来确定（Molloy et al. 1995）。

**ATP 更替的测量**

通过直接观察荧光 ATP 类似物 2′-*O*-，3′-*O*-Cy3-EDA-APT（Cy3-ATP）的结合-解离过程就可以测量单分子单头肌球蛋白上的单一 ATP 水解循环（Tukunaga et al. 1997）。Cy3-ATP 受棱镜型 TIRFM 产生的逝场光激发。光束以大于临界角的角度入射于熔凝石英玻片（高反射率）与水性溶液（低反射率）之间的界面上以产生全内反射。这会产生一个 1/*e* 穿透深度的逝场，从载玻片表面到水溶液深约 150 nm。在溶液中加入 10～100 nmol/L 的 Cy3-ATP，用于检测 ATP 的结合和解离事件。在此浓度范围内，来源于溶液中游离 Cy3-ATP 的背景荧光已经足够低，可以观察结合于肌球蛋白头的 Cy3-ATP 或 Cy3-ATP（<1%）的荧光光斑。由于肌球蛋白与 ATP 的亲和力（约 $10^{-11}$）远高于与 ADP 的亲和力（约 $10^{-6}$），因此 Cy3 核苷酸的结合-解离事件应是反映了单一 ATP 的更替事件。

**数据的获取和分析**

来源于雪崩光电二极管（ATP 水解成像）和象限光电二极管检测器（纳米检测）的数据同时通过电脑的数码数据记录器采集。采用捕获微珠等同弹性常数，测得从光阱中心到微珠的距离，便可据此计算得到肌球蛋白头部产生的力。在这种弹性常数很小的条件下（0.02～0.06 pN/nm），微珠的热运动振幅约十几个纳米。另外，捕获微珠的等同弹性常数（$k$）可以用均分定律通过该微珠的布朗运动来确定，$k\langle x^2\rangle/2 = k_B T/2$，式中，$k_B$ 为布朗常数；$T$ 为绝对温度。肌球蛋白产生步移的起点和终点可以通过自定义的刚性度阈值加以确定。为了计算刚性度，位移数据需要通过一个 12 kHz 带宽的低通滤光器。每 50 ms 切换一次 100 ms 的时间窗，计算出时间窗内的布朗运动的变异。为了分析 ATP 的更替，通过自定义荧光强度的阈值就能确定荧光的上升相和下降相。

图 15-3 所示的是肌球蛋白分子位移的典型轨迹及同步记录的 ATP 的更替。位移记录显示，步行发生于刚性度增高时，也即提示肌球蛋白与肌动蛋白强烈相互作用时。当肌球蛋白从肌动蛋白上解离下来时，肌动蛋白丝便回复到原来的位置。在 Cy3-ATP 荧光的时间轨迹中，在单分子肌球蛋白头部的位置荧光光斑以分步方式出现和消失。比较机械事件和 ATP 更替的时间耦合显示，当核苷酸（极可能是 ADP）解离时肌球蛋白头部发生步移，而与 ATP 结合到肌球蛋白上的同时肌球蛋白头部步移回到原来的位置。

**肌球蛋白-肌球蛋白棒组合微丝**

单头肌球蛋白-肌球蛋白棒部组成的组合微丝一直以来作为一种工具使单分子肌球蛋白能以一定的取向贴附到玻璃表面，并且未因与玻片表面相互作用而引起损害。为了形成肌球蛋白共聚丝，含单头肌球蛋白及其棒的混合物（混入 1% Cy5 标记的棒使之可视化）的溶液内的盐浓度通过透析从 0.6 mol/L 降至 0.15 mol/L。总蛋白质浓度设定为 0.15 μmol/L。单头肌球蛋白与肌球蛋白棒的比例为 1∶1000，这种低比例确保了在 5～8 μm长度的共聚肌球蛋白丝中平均只有 1 或 2 个肌球蛋白的头。肌球蛋白共聚丝被结合于经硅树脂（Sigmacote，Sigma-Aldrich）和小牛血清白蛋白（BSA，Sigma-Aldrich）预处理的玻片表面（Ishijima et al. 1996）。BSA 用来减少肌动蛋白微丝和中性链亲和素包被的微珠与玻璃表面的非特异性结合。组合微丝中单一头部的肌球蛋白分子

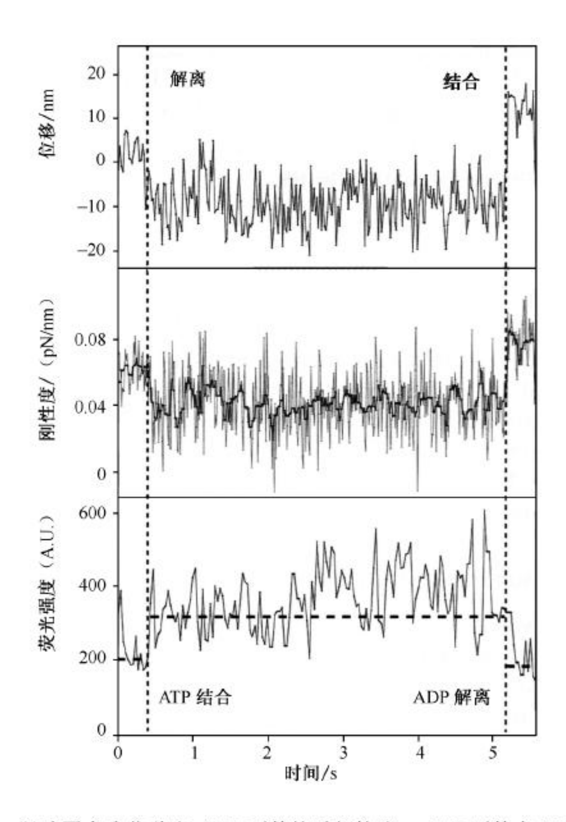



图 15-3　肌球蛋白头位移和 ATP 更替的时间轨迹，ATP 更替在 100 nmol/L Cy3-ATP 和 1 μmol/L 未修饰 ATP 条件下测量。上方为位移的时间过程，数据经带宽为 100 Hz 的低通滤光器过滤。中间为刚性度的变化，刚性度通过计算微珠热运动的变异得到。浅色线为原始数据，深色线为通过中滤光器的数据，二者相叠加。下方轨迹显示在肌球蛋白头部 Cy3 核苷酸荧光强度的改变，数据经 ICCD 获取的图像转换而来。

的数量可以通过观察结合到组合微丝上的 Cy3-ATP 分子的荧光来计算。实验方案 3 描述了用于测量 ATP 水解和肌球蛋白位移的肌球蛋白-肌球蛋白棒组合微丝的样本制备。

**Cy3-ATP**

Cy3-ATP（2′-*O*-,3′-*O*-Cy3-EDA-ATP）的前体 EDA-ATP {2′-*O*-,3′-*O*-［*N*-(2-氨乙基）氨基甲酰］-ATP} 根据 Jameson 和 Eccleston（1997）的方法来合成和纯化。Cy3-ATP 用 EDA-ATP 和 Cy3-NHS-ester 合成。反应混合物使用快速蛋白质液相色谱（FPLC）DEAE 纤维素柱（DE52，Whatman）阴离子交换层析来纯化。异构体 Cy3-ATP（2′-*O*-,3′-*O*-Cy3-EDA-ATP）用高效液相色谱（HPLC）反相色谱柱（Novapack C18，3.9 mm×150 mm；Waters；详见 Oiwa et al. 2000）来分离。核糖环（2′-或 3′-）的修饰位置影响许多酶底物的功能特性（Oiwa et al. 2000，2003；Nishizaka et al. 2004）。用 HPLC 反相色谱纯化纯度可以大于 99%（基于 Oiwa 方法）。

### 光漂白

由于 Cy3 光漂白和与核苷酸解离都造成荧光信号的突然下降，使得很难区分荧光信号的改变是由哪一种原因造成的。从已知的漂白和解离率有可能估算 Cy3 核苷酸解离前漂白事件发生的概率。Ishijima 等（1998）给出了一个用我们的测量系统得到的比率的例子。在钒存在的情况下结合到玻璃表面并结合到肌球蛋白头部的 Cy3 核苷酸的光漂白率是 1000 光子/s（0.008±0.002）$s^{-1}$，这足以观察一个荧光基团。从光阱测量得到的肌动球蛋白的结合速率常数约为 0.13 $s^{-1}$，远远大于光漂白率。从这些数值来看，结合的核苷酸解离前光漂白发生的概率约为 $1-\exp(-0.008\ s^{-1}/0.13\ s^{-1})$ 约等于 6%。因此观察到的荧光强度的减弱最常见（94%）的原因是结合的 Cy3 核苷酸的解离。

据报道，即使在陷阱激光波长处没有明显的吸收，Cy3 染料同时暴露在光阱和荧光激发时光漂白率增加（van Dijk et al. 2004）。光阱激光对结合在肌动球蛋白微丝上的 Cy3 核苷酸的光漂白率的影响符合高斯函数 $\sigma=1.3\ \mu m$（T. Komori，未发表）。根据这一结果，光阱激光不会影响距其 4 μm（$>3\sigma$）远，结合到球蛋白的 Cy3 核苷酸的光漂白率。

### ATP 水解和肌球蛋白功能的关联

使用同步测量，能量输入的化学反应和肌球蛋白的机械活动输出之间的耦合可直接确定。对于能量转换来说，ATP 化学反应如何与机械活动相关是最重要的问题之一。对肌球蛋白生理生化的研究表明，力的产生与磷酸的释放有关，在 ATP 水解周期，肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用从弱到强（Lymn and Taylor 1971）。但是迄今没有获得直接的实验证据。单分子测量技术提供了同步测量和比较同一分子两个参数的可能性。我们发现肌球蛋白从肌动蛋白微丝上解离与 ATP 结合到肌球蛋白同时发生，但 ADP 解离后力随时间而变（Ishijima et al. 1998）。为了更好地解释这些结果以及生化数据，仍需进行多次实验并进一步改进技术使得测量更加精确。这将是了解肌动球蛋白和其他系统能源转换机制的一个重大步骤。

## 用纳米探针测量肌球蛋白行进的步进

用操纵技术如光阱可以测量 ATP 水解产生的肌球蛋白的步进。在这些实验中，肌动蛋白丝的末端与珠子相连并被操纵。固定在玻璃表面的单一肌球蛋白分子的步进运动可以通过追踪附在肌动蛋白微丝上的珠子的位移来表征（Finer et al. 1994）。取代操纵肌动蛋白微丝，我们捕获了单分子肌球蛋白分子到扫描探针上并让它与固定在玻璃表面的肌动蛋白微丝相互作用（Kitamura et al. 1999，2005）。单分子荧光成像技术可以使捕获肌球蛋白分子的过程可视化。肌球蛋白分子的运动可以跟踪扫描探针顶端的位移来跟踪。观测到的肌肉肌球蛋白的步进连接 ATP 水解与光阱测量相符，分解成几个步距前进。在放大的时间坐标上观察到的位移上升阶段不是突然发生的，而是阶梯式渐进。步距始终是 5.5 nm，相当于肌动蛋白单体的大小。步距之间的间隔时间与 ATP 浓度无

关。大多数肌球蛋白朝一个方向前进，也有少数朝相反的方向行进。结果提示肌球蛋白头部的热运动是沿肌动蛋白单体行进的，而整体运动是朝某一方向的。

## 仪器

### 单分子扫描探针显微镜

整个装置基于透射荧光显微镜（IMT2，Olympus，日本）（图 15-4）。为了尽量减少振动和热漂移，显微镜放在有隔音和空调的房间的气动工作台上。样本盖玻片放在闭环压电驱动平台上（P-730.20，Physik Instrumente，德国）以实现精细位置控制。微型驱动器（图 15-4 *XY*平台，DMY-15；Sigma Koki，日本）用于粗调 *X-Y* 轴。样品台旁的扫描探针支架是独立于样本台的手控装置（图 15-4 *XYZ* 平台）。一维压电平台（P-753.11C Physik Instrumente，Germany）附在 *XYZ* 平台上用于精密控制 *Z* 轴。

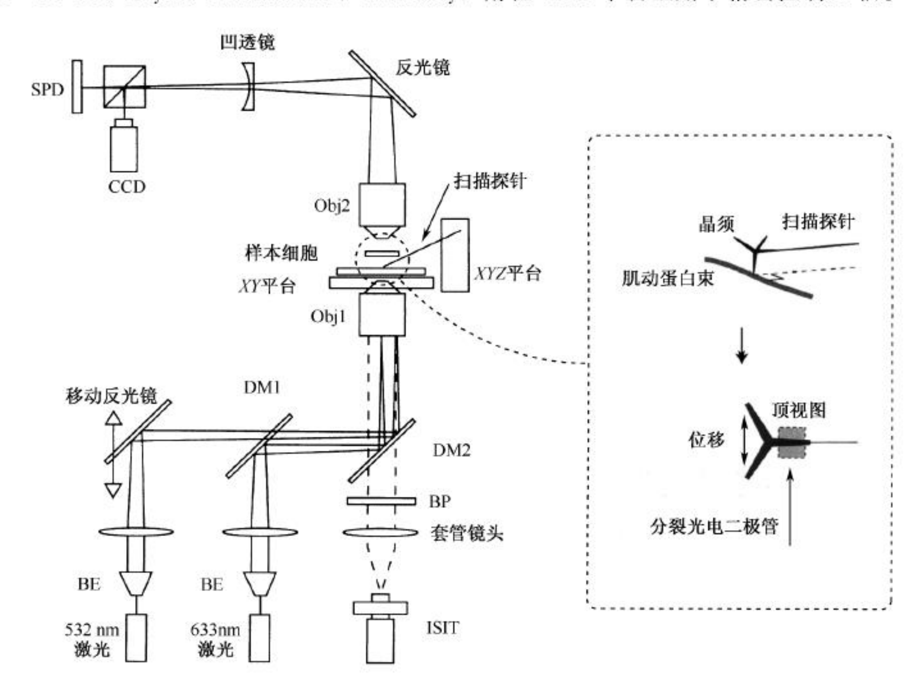



图 15-4　单分子扫描探针显微镜的示意图。SPD 为分裂光电二极管；Obj 为物镜；DM 为分色镜；BP 为带通滤光片；BE 为扩束器；ISIT 为图像增强耦合 SIT 照相机（详见文中介绍）。右图为扫描探针尖端详图。四足状晶须的一条腿粘在扫描探针上。扫描探针尖端的位移通过阴影框中投射的部分晶须图像到分裂光电二极管测量。

二极管泵浦倍频 Nd：YAG 激光器（HK-5520，Shimaze，日本；λ = 532 nm）作为纳米测量（透射光照明）和单分子成像（物镜型 TIRFM）的共同光源。激光的线性偏振光通过 1/4 波片扩展聚焦在物镜（Obj1，100×PlanApo NA＝1.40，Olympus，日本）的后焦面。一活动镜子用来切换透光照明和 TIRFM。氦-氖激光（05-LHP-928，Melles Griot；λ＝633 nm ）用来照射 Cy5-肌动蛋白束。使用类似程序来监控单分子捕

获实验的探针位置。红色氦-氖激光降低了 Cy3-生物素-依赖转羧基酶（BDTC）-S1 光漂白的可能性。氦-氖激光发出的光束扩展聚焦，然后通过分色镜（DM1，DM605，Asahi Spectra Co.，Ltd.，日本）沿与绿光激光相同的路径顺行。两激光束通过双波长分色镜（DM2，Sigma Koki，日本）传入物镜。Cy3-肌球蛋白头部的单分子荧光通过带通滤光片（BP，FF562-Em02，Semrock）收集，通过图像增强器（C8600-03，Hamamatsu Photonics，日本）耦合硅增强靶（SIT）照相机（C2741-08，Hamamatsu Photonics，日本）检测。

放在扫描探针尖端的晶须图像通过长工作距离物镜（Obj2，60×DIC/LWD，Nikon，日本）和凹透镜传输放大约 300 倍。探针放大的图像投射到分裂二极管（SPDS2721-02，Hamamatsu Photonics），二极管的差分输出可作为扫描探针的位移记录下来。输出信号以 16 位分辨率 24 kHz（LX10；TEAC，日本）放大和记录用于进一步分析。如果用绿色荧光蛋白（GFP）-肌球蛋白代替 Cy3-肌球蛋白用于单分子探测，需选择合适的固体激光器（Sapphire 488-20-CDRH，Coherent；λ=488 nm）和分色反射镜（Okada et al. 2007）。

**制备扫描探针**

扫描探针由细玻璃针和 ZnO 晶须组成（图 15-5 右）。细玻璃针由玻璃棒拉制而成（图 15-5）。直径为 1.1 mm 的玻璃棒中央用玻璃电极拉制仪加热拉制成直径约 0.3 μm 或 50 μm 的玻璃纤维（图 15-5 步骤 1）。玻璃纤维中间用热细铂丝切断（图 15-5 步骤 2）。用环氧树脂将约 0.3 μm 和约 50 μm 的纤维粘在一起，细纤维长度在 50～100 μm（图 15-5 步骤 3 和步骤 4）。玻璃纤维的弹簧常数可从细玻璃纤维的长度和厚度测得。ZnO 晶须（由 Central Research Laboratories，Matsushita Electric Industrial Co.，Ltd. 赠送）有一个四脚状结构，足部的典型长度是 5～10 μm，尖端半径约 15 nm。这种晶体

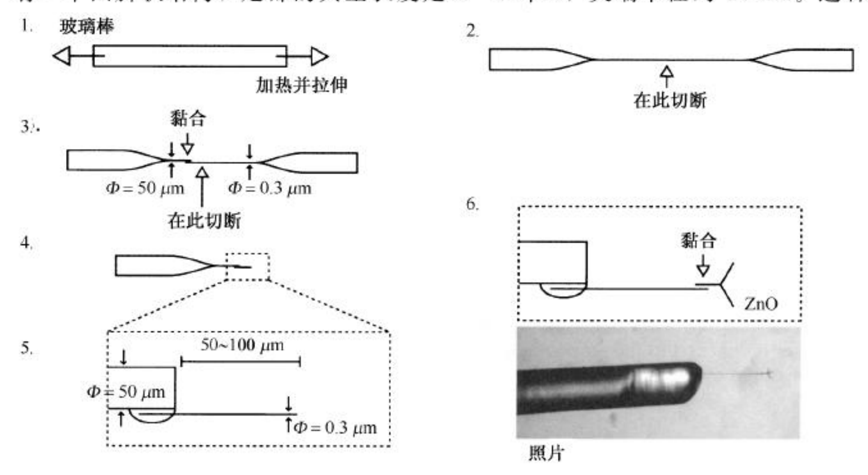



图 15-5 扫描探针的制备。扫描探针由玻璃微针和 ZnO 晶须组成。玻璃棒拉制成的相对粗和细的玻璃微针（步骤 1 和步骤 2）连接在一起（步骤 3～步骤 5）。晶须附在细玻璃纤维上（步骤 6）。制备完成的扫描探针见底图。约 50 μm 粗的纤维（左）连上一根细约0.3 μm 的纤维，ZnO 晶须附在细玻璃纤维的右端。

用作扫描探针尖端是由于足边的曲率半径小到足以和单个肌球蛋白分子相接触。

晶体首先由3-氨丙基三乙氧基硅烷氨基硅烷化然后通过 biotin-$(AC_5)_2$-Osu (Dojindo Laboratories，日本) 生物素化。在双目显微镜下将生物素化的ZnO晶须用环氧树脂粘在细玻璃纤维的顶端并使一足朝下 (图15-5步骤6)。扫描探针的抗弯刚度 (弹性常数) 可以根据能量均分定理测量热波动均方根来标定或对校准的玻璃针交叉校正 (Kishino and Yanagida 1988)。ZnO晶须的抗弯刚度大约2 N/m，超过玻璃针10 000多倍。因此，晶须的弯曲不会影响玻璃纤维的位移。对于标准尺度最柔韧的玻璃针扭曲引起的顺应性为0.5～1.0 nm/pN。

**扫描探针的刚度和测量分辨率**

由于扫描探针的刚度，探针处于自由状态下分辨率不足以测量约5 nm的步距。自由探针振幅 $\langle \Delta x^2 \rangle^{1/2}$ 的均方根 (rms) 与刚度的关系为 $\langle \Delta x^2 \rangle^{1/2} = (k_B T/k_{probe})^{1/2}$，式中，$k_{probe}$ 为扫描探针刚度。自由探针的响应时间 (如测得63%的最大位移的时间) 定义为 $\tau = 1/(2\pi f_c) = \zeta / k_{probe}$，式中，$f_c$ 为探针热运动功率谱的转角频率；$\zeta$ 为探针的摩擦系数。对于 $k_{needle} = 0.01$ pN/nm 的扫描探针，振幅的均方根约为15 nm，响应时间为5 ms。肌球蛋白与肌动蛋白相互作用时刚度可由热波动来估算。通常估算的刚度 $k_{s1}$ 约1 pN/nm。位移过程响应时间 $\tau = \zeta / (k_{s1} + k_{probe})$，小于0.2 ms。而扫描探针的波动 $\langle \Delta x^2 \rangle^{1/2} = (k_B T/[k_{s1} + k_{needle}])^{1/2}$，小于2 nm。由此5.5 nm的步距可以测得。

## 单分子肌球蛋白操纵和用扫描探针的纳米尺度测量

实验方案4介绍了操纵单个肌球蛋白分子和使用扫描探针进行纳米测量的方法。当捕获单个肌球蛋白单分子头部时，抑制黏附在肌球蛋白S1的Cy3的光漂白很重要，因为有Cy3光漂白的S1分子在我们的实验方法里不能确认是单分子。关闭绿光激光使用氦-氖激光 ($\lambda = 632.8$ nm) 观察针的热波动来监控探针到表面的接触。在检测前约5 min完成所有的准备工作，确认在玻璃表面结合到S1的Cy3的光漂白是否可以忽略不计。比较有或者没有照明 (氦-氖激光或房间灯光) 情况下荧光点的数目。根据我们的经验，Cy3的光漂白是可以忽略不计的。这样，在绿色激光照射前Cy3不太可能发生光漂白。

Myc标记的系统可以取代生物素-亲和素系统连接S1和扫描探针。Okada等 (2007) 将Myc标签和S1融合在一起，探针尖端非特异地包被上c-myc单克隆抗体。

**位移的测量**

位移测量采用将探针带上S1分子然后靠近肌动蛋白束的方法。肌动蛋白束的使用增加了探针靠近时S1分子和肌动蛋白微丝的结合机会，使测量更有效。然而，在α-辅肌动蛋白形成的肌动蛋白束中，肌动蛋白微丝随机地以平行和反平行方式排列。这可通过肌球蛋白沿肌动蛋白束两个方向都能行进来判定。这一事实告诉我们，扫描探针测量位移方向并不都一致。在这些测量中，大多数位移的走向定义为方向。在单一位移产生时，S1在肌动蛋白微丝之间跳跃是不太可能的，因为与束中微丝之间的间隔相比，探针的热波动很小。晶须的抗弯刚度约为2 nN/nm，然而针的纵向刚度要大得多。因此，在垂直于肌动蛋白束的方向上，附在探针上的S1的热波动应该小于1 nm。通过α-辅肌动蛋白彼此交联形成的肌动蛋白微丝之间的间隔估计和α-辅肌动蛋白分子的大小相当，

或约 20 nm。

图 15-6A 上显示了一个典型的位移的时间过程。获得的数据通过一个数字递归 Chebyshev I 型或 2 kHz 带宽 Butterworth 滤波器（DADiSP，DSP Development Corp.，USA）。肌球蛋白头部和肌动蛋白的相互作用可以清楚地由刚度增加发现。在放大的标尺上，可以观察到步长为 5.5 nm 的逐步移动（图 15-6B）。步距的步长可以从直方图的成对距离（pairwise distance）上计算得到（图 15-6C）。成对距离分析之前，位移的上升阶段进一步用等级 2 非线性中值滤波器过滤。成对距离计算位移上升阶段所有数据点之间的差异。用 Origin（OriginLab Corp.，USA）的 Levenberg-Marquardt 算法可以发现，成对距离的直方图很好地符合几个高斯分布的总和。成对距离直方图的峰值可以用功率谱确证。对应于 5.5 nm 峰值，频率为 0.18 $nm^{-1}$（图 15-6D）。

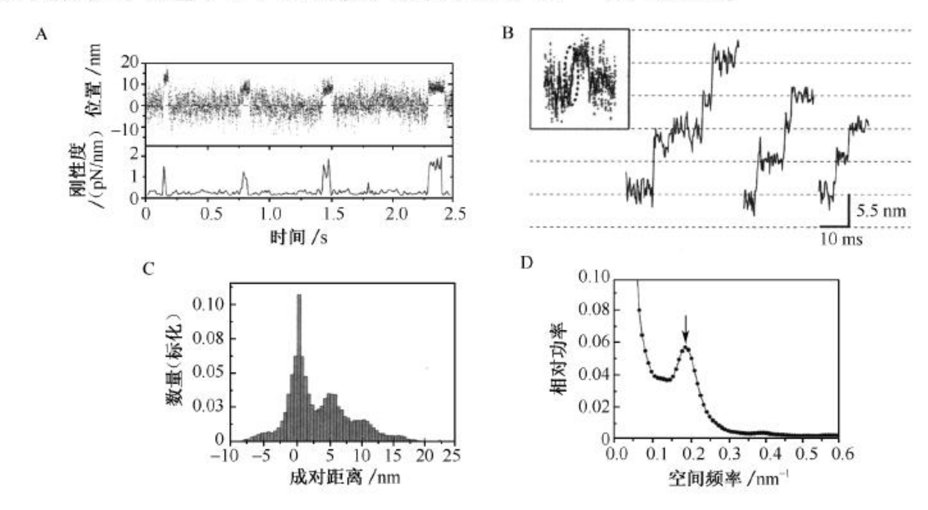



图 15-6　肌球蛋白行进的步距测量。A. 肌球蛋白 S1 位移的记录。这些数据通过一个 2 kHz的带通滤波器获得。扫描探针的弹簧常数为 0.03 pN/nm。图下部是通过探针位移差异计算得到的刚度。B. 行进中的步距。插图是放大的时间刻度上上升阶段的位移记录。C. 位移上升阶段的成对距离的直方图。D. 成对距离功率密度谱直方图。

**荧光标记的肌球蛋白头部**

为了使单一肌球蛋白分子附到晶须尖端并可视化，需要制备荧光标记和生物素化的肌球蛋白 S1（Cy3-BDTC-S1）。含有鸡胗肌球蛋白调节轻链的重组融合蛋白的半胱氨酸残基与 BDTC-RLC 融合并标记上荧光染料分子 Cy3。由于在 280 nm 处 BDTC-RLC 的消光系数非常低［<0.2 $(mg/ml)^{-1}\cdot cm^{-1}$］，因此 Cy3-BDTC-RLC 的总量由聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）来分析。Cy3-BDTC-RLC 中 Cy3 的密度由 552 nm 处的吸光值确定（消光系数＝150 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$）。标记率为 0.98～1.02 的 Cy3-BDTC-RLC 样本可用于实验。标记上 Cy3 的 BDTC-RLC 替换内源性 S1 的 RLC。由此产生的 S1 与 Cy3-BDTC-RLC 标记比用分光值来确定，S1 的消光系数为 0.83［$(mg/ml)^{-1}\cdot cm^{-1}$，280 nm］。典型的标记比大于 0.95。

**肌动蛋白束**

用肌动蛋白束代替单一肌动蛋白微丝可以促进肌球蛋白头部分子附在扫描探针上，从而使单一肌球蛋白头部分子与肌动蛋白相互作用。肌动蛋白单体在 Cys-374 处标记上 Cy5-马来酰亚胺使肌动蛋白束可视化。Cy5 标记的肌动蛋白束通过在 4℃检测缓冲液中加入 α-肌动蛋白到终浓度为 0.56 μmol/L 和与 Cy5 标记的肌动蛋白微丝摩尔比 1∶40 来制备。

### 扫描探针与单分子成像相结合的优点

光阱实验中，蛋白质分子附着在珠子上，并且单分子由统计学来确证（Svoboda and Block. 1994）。相比之下，用纳米尺度测量方法，蛋白质分子一个个附着在扫描探针上。结合扫描探针技术的单分子成像，单个肌球蛋白分子可以被观察到并进行机械测量（Kitamura et al. 1999，2005）。单分子荧光成像技术是保证单个扫描探针黏附单分子的最可靠方法之一。Cy3 标记到肌球蛋白轻链以尽量减少探针的影响。标记和轻链交换后，Cy3 与肌球蛋白的标记比可大于 97%。未标记的肌球蛋白分子的影响可以忽略不计。虽然 GFP 的光稳定性不及 Cy3，但由于光漂白易确定，所以肌球蛋白也可用 GFP 与肌球蛋白重链融合来标记。

纳米测量技术得到的数据与其他技术得到的结果一致，而关于步移的更进一步细节得到了解决。例如，最近用这种方法鉴定了肌球蛋白 V 的步距是 5.5 nm（Okada et al. 2007）。而用其他技术，如光阱，即使用增加刚度来提高分辨率仍未检测到步距（Ruff et al. 2001；Steffen et al. 2001；Capitanio et al. 2006）。这可能是由于扫描探针的方法显著放慢了反应过程。在进行肌球蛋白头部运动观测时，还必须考虑如何安置蛋白质和探针以及自由运动对结果的影响。用探针系统，肌球蛋白头部的运动限于模拟肌肉运动（Kitamura et al. 2005）。因此，这种方法得到的结果潜在的提供了肌肉肌球蛋白头部协作方式运动的力学特征基础。

## 总结和结论

本章中，我们描述了结合单分子成像和操纵技术的两个富有挑战性的测量系统。旨在了解肌球蛋白通过 ATP 水解产生的能量转换为物理运动过程的能量转换机制。然而，这些方法应延伸为更多的定量分析并能易于操作，并可进一步应用到其他分子马达和生物系统中。除了肌动球蛋白系统，测量系统还可以简化。这两种互补的方法可以同步测量生物分子输入输出的关系，而生物分子结构功能和扫描探针测量将用于了解生物大分子间的相互作用。

# 实验方案 1：载玻片的化学蚀刻

本实验方案描述了载玻片基座的化学腐蚀过程（图 15-1）。研究肌动蛋白-肌球蛋白相互作用实验中基座促进了肌球蛋白-肌球蛋白棒部组合微丝到黏附在珠子上的肌动蛋白微丝。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜！＞的材料。

### 试剂

铬＜！＞

铬腐蚀液［7.5 wt% $HClO_4$＜！＞，12.1 wt%（$NH_4$）$_2$Ce（$NO_3$）$_6$＜！＞，80.4wt% $H_2O$］

显影剂（AZ developer，Hoechst）＜！＞

乙醇（99.5%）

$H_2SO_4$＜！＞

KOH（0.1 mol/L）＜！＞

$NH_4F$＜！＞

光刻胶（AZ RFP210K，Hoechst，日本）＜！＞

### 仪器

玻璃盖玻片（熔融石英，面积 26 mm×55 mm，厚 0.8 mm；Matsunami，日本）

条纹状罩（宽 10 μm）

UV 灯＜！＞

真空蒸发器

## 方法

1. 用 0.1 mol/L KOH 和 99.5%乙醇清洗盖玻片。
2. 用真空蒸发器在清洁的盖玻片表面镀铬，然后涂光刻胶。
3. 用紫外照射宽 10 μm 的条纹图案罩，使玻璃表面印上条纹图案。
4. 使保护膜显影然后从紫外照射区移开。
5. 在不受耐铬腐蚀液保护区内去除铬层。
6. 配置含 3% $NH_4F$ 和 50% $H_2SO_4$ 的溶液。用该溶液在 25℃蚀刻盖玻片表面 15 min。
7. 用去离子水冲洗蚀刻的玻璃，用铬腐蚀液去除剩余的铬。

这种方法生产的基座大约宽 7 μm，深 1 μm。

## 实验方案 2：肌动蛋白的荧光标记和生物素化

本实验方案介绍了荧光标记和在肌动蛋白 Cys374 上连接生物素-PEAC$_5$-马来酰亚胺来生物素化肌动蛋白微丝的方法。使用生物素-中性链亲和素系统肌动蛋白微丝可以实现可视化和黏附在珠子上。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

#### 试剂

检测缓冲液（AB；25 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，20 mmol/L HEPES-KOH <!> pH7.6）

肌动蛋白微丝（来自兔骨骼肌肉）

ATP(pH 7.0，用 NaOH<!>调节 pH）

生物素-PEAC$_5$-马来酰亚胺（Dojindo Laboratories，日本）

生物素-X-五甲烯二胺（Invitrogen Molecular Probes）

牛血清白蛋白（BSA，1 mg/ml，溶于 AB 中）

Cy5-鬼笔环肽［从 Cy5-NHS ester<!>（GE Healthcare）和氨基-鬼笔环肽<!>合成（Alexis Biochemicals)］

EDC［*N*-ethyl-*N*′-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide］（Dojindo Laboratories，日本）<!>

F 缓冲液（FB；0.1 mol/L KCl<!>，10 mmol/L HEPES-KOH<!>pH 7.8，含 4 μmol/L Cy5-鬼笔环肽）

G 缓冲液（GB；0.1 mmol/L ATP，0.2 mmol/L $CaCl_2$ <!>，10 mmol/L HEPES-KOH<!>pH 7.8）

微球体（polybead carboxylate 1.0 μm；Polysciences，Inc.）

中性链亲和素（Invitrogen Molecular Probes）

磷酸盐缓冲液（200 mmol/L，pH7.0）

#### 设备

透析盒（Slide-A-Lyzer；Pierce 66415）

### 方法

1. 按摩尔比 1∶5 混合肌动蛋白微丝和生物素-PEAC$_5$-马来酰亚胺。25℃搅拌 1 h。
2. 去除未结合的生物素-PEAC$_5$-马来酰亚胺，用透析盒对 GB 透析去极化生物素化肌动蛋白微丝至 G-肌动蛋白。
3. 按摩尔比 19∶1 在 FB 中混合兔骨骼 G-肌动蛋白和生物素化 G-肌动蛋白来获得肌动

蛋白微丝。

4. 加 Cy5-鬼笔环肽（终浓度 4 μmol/L）到生物素化肌动蛋白微丝（0.1 mg/ml）。

## 珠子的生物素化

5. 在 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）和 20 mmol/L EDC 中，混合 500 μl 2.5%（*m*/*V*）微球体（1.0 μm 表面带羧基的聚苯乙烯乳胶珠子）和 50 μl 1 mg/ml 生物素-X-五甲烯二胺。25°C 温浴 30 min。
6. 用多次离心（常用 10 次）洗去未结合的生物素-X-五甲烯二胺和 EDC。
7. 将生物素化的珠子悬浮于 500 μl 20 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）中。加入 25 μl 1 mg/ml 的中性链亲和素。25°C 温浴 30 min。
8. 用多次离心（常用 10 次）洗去未结合的中性链亲和素。
9. 在 1 mg/ml BSA 溶液中温浴 2 min，使珠子包被上 BSA。
   这一步可以防止珠子吸附到玻璃表面。
10. 多次离心（常用 10 次）洗去多余的 BSA，然后悬浮在 500 μl AB 中。

# 实验方案3：ATP水解和肌球蛋白位移测量的样品制备

本实验方案描述了用于ATP水解和肌球蛋白位移测量的样品制备。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜！＞的材料。

### 试剂

检测缓冲液（AB；25 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，20 mmol/L HEPES-KOH＜！＞pH7.6）
丙酮（99.5%）＜！＞
牛血清白蛋白（BSA；10 mg/ml，溶于AB）
Cy3-ATP（2 μmol/L，溶于双蒸水）
Cy5-鬼笔环肽标记的肌动蛋白微丝（0.1 mg/ml，溶于FB）
去污剂（dcn90；AR Brown Co.，Ltd.）
乙醇（10% *V*/*V*）
KOH（0.1 mol/L）＜！＞
肌球蛋白-肌球蛋白棒部组合微丝（10～100 nmol/L，溶于AB）
中性链亲和素珠子（2.5% *m*/*V*，溶于AB）
氧清除系统（4.5 mg/ml葡萄糖，36 μg/ml过氧化氢酶，216 μg/ml葡萄糖氧化酶＜！＞，0.1% *V*/*V* β-巯基乙醇＜！＞）
Sigmacote（Sigma-Aldrich）

### 设备

湿盒
化学蚀刻玻璃（实验方案1）
盖玻片（18 mm×18 mm，1号厚度；Matsunami，日本）
指甲油
纸夹
聚酯垫片（50 μm厚；Toray，日本）

## 方法

1. 使用前用去污剂（dcn 90）、100%丙酮和0.1 mol/L KOH清洗化学蚀刻玻璃和盖玻片。将所有玻璃保存在10%（*V*/*V*）乙醇中防止细菌生长。
2. 用Sigmacote包被化学蚀刻玻璃（此反应瞬时即可）。处理过的薄片在化学通风柜中干燥。用去离子水冲淋玻璃表面。
3. 将盖玻片（18 mm×18 mm，1号厚度）盖在用聚酯垫片（厚50 μm）隔开的化学蚀

刻玻片上，形成一个 10 μl 的微室，用纸夹夹紧。

4. 将 BSA 溶液加到微室，在湿盒中放置 2 min。用 100 μl AB 洗涤。
5. 将肌球蛋白-肌球蛋白棒部组合微丝（10～100 nmol/L 溶于 AB）溶液加到微室，在湿盒中放置 5 min。用 1 ml AB 洗涤。
6. 用含有氧清除系统、20 nmol/L Cy3-ATP、Cy5-鬼笔环肽标记的肌动蛋白微丝（50 ng/ml）和中性链亲和素珠子（0.01% *m/V*）的检测缓冲液灌流（见排疑解难）。
7. 移去聚酯垫片，洗掉多余溶液，用指甲油封片。
8. 用隐失场和光阱技术同步检测 STP 水解和肌球蛋白位移（见排疑解难）。

## 排疑解难

**问题**：荧光背景太强。

［**步骤 8**］

**解决方法**：当 Cy3-ATP 的浓度超过 100 nmol/L 时，荧光点会因为溶液中游离的 Cy3-ATP 增加了背景而使得荧光点变得模糊。为了得到高信噪比（SNR）的荧光图像，Cy3-ATP 的浓度应小于 100 nmol/L。然而这一浓度不是生理范围，少于几乎所有类型肌球蛋白和许多其他酶的 $K_m$ 值。某些情况下 Cy3 的交联降低了 ATP 与肌球蛋白的亲和力。为了衡量生理条件下 ATP 的更替，可额外增加未修饰的 ATP（Nishizaka et al. 2004）。在这种情况下能监测机械活动的时间反应，但不能观察到所有 ATP 的更替。

**问题**：非荧光 ATP 污染。

［**步骤 6**］

**解决方法**：即使没有补充未修饰的 ATP，蛋白质制备过程中污染的 ATP 也能造成转换事件不可见。使用前，用凝胶过滤可以去除污染的 ATP。溶液中游离的 Cy3-ATP 的光漂白也可能形成非荧光 ATP。这种可能性可用降低照明总量（约 $10^{10}$ μ$m^3$）至 $10^7$ 倍以下（约 $10^3$μ$m^3$）来排除，因为 Cy3-ATP 的扩散是非常迅速的（约 1 μm/ms）。

# 实验方案 4：单分子肌球蛋白操纵技术和扫描探针纳米测量技术

本实验方案描述了从固定在盖玻片上的肌动蛋白束捕捉单个肌球蛋白的方法。在 532 nm 照明下通过观察 Cy3 的荧光和光漂白来确认单一肌球蛋白分子的捕获。这也使得肌球蛋白 S1 分子数目能够计算，位移可以测量。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

丙酮（99.5%）＜!＞

α-辅肌动蛋白（0.1 mg/ml，溶于 AB）

检测缓冲液（AB；25 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，20 mmol/L HEPES-KOH ＜!＞pH7.8）

ATP（100 mmol/L，溶于双蒸水）

Cy5 标记的肌动蛋白束溶液（0.1 mg/ml，溶于 0.1 mol/L KCl 和 10 mmol/L HEPES-KOH ＜!＞pH7.8）

KOH（0.1 mol/L）＜!＞

肌球蛋白 S1，用 Cy3 标记的、生物素依赖的转羧基酶（BDTC)-RLC（调节轻链）荧光标记和生物素化的（Cy3-BDTC-S1）

氧清除系统（4.5 mg/ml 葡萄糖，36 μg/ml 过氧化氢酶，216 μg/ml 葡萄糖氧化酶＜!＞，0.1% *V*/*V* β-巯基乙醇）

中性链亲和素溶液（1 mg/ml，溶于 AB）

### 设备

吸液器（泵驱动）

盖玻片（24 mm×32 mm，1 号厚度；Matsunami，日本）

融合有 2 个玻璃垫片（厚 1 mm）的盖玻片

偶联硅增强靶（ISIT）摄像机的图像放大仪（C8600-03，Hamamatsu Photonics，日本）

指甲油

附有 ZnO 晶须的扫描探针

## 方法

### 肌球蛋白头部的单分子捕获

1. 在 0.1 mol/L KOH 溶液中超声清洗盖玻片。在丙酮中浸泡，然后用 $H_2O$ 冲洗。
2. 用指甲油在盖玻片上划线形成两个单独的方块。

这些方块用于捕获单一肌球蛋白分子和纳米测量。

3. 室温将盖玻片浸泡在 α-辅肌动蛋白（0.1 mg/ml）溶液中 1 min 包被盖玻片表面。
4. 用 1 ml AB 洗去未吸附的 α-辅肌动蛋白。溶液从微室前面加入，用泵驱动吸液器从后面吸出。
5. 将 Cy5 标记的肌动蛋白束溶液加到盖玻片两个方块中，放置 5 min。
6. 用 AB 洗去未结合的肌动蛋白束。
7. 在无 ATP 存在情况下，向其中一个方块的 AB 中加入约 $10^{-16}$ mol/L 的 Cy3-BDTC-S1。放置 5 min。
8. 用含有氧清除系统的 AB 洗去未结合的 Cy3-BDTC-S1（见试剂）以降低光漂白。
9. 用如下方法用链霉亲和素包被扫描探针头部 ZnO 晶须。
   i. 将尖端放在生物素化肌球蛋白 S1 外面的玻璃表面。
   ii. 将链霉亲和素（1 mg/ml）浇注在尖端。
   iii. 温浴 5 min 后，用 1 ml AB 清洗，然后将链霉亲和素包被的探针移到 Cy3-BDTC-S1。

   一旦探针尖端浸泡入溶液，将它保持在溶液中以防止表面张力造成的损害。
10. 用如下方法在扫描探针顶端捕获一个 S1 分子。
    i. 将探针指向荧光肌动蛋白束，和严格限制的 Cy3-BDTC-S1 相接触。确保蛋白束与探针垂直，使肌球蛋白头部与肌动蛋白微丝成直角。
    ii. 大约 5 min 后，将探针提起。重复此过程（共 5 次）保持盖玻片 *XY* 轴位置不动。监测扫描探针热波动的降低来观察探针与表面的接触。

## 单肌球蛋白的确认

11. 532 nm 光照下，与附着在玻璃表面的单一 Cy3-BDTC-S1 比较点的荧光强度。
12. 光漂白后，通过计数光漂白过程的步骤来计数附着在扫描探针上的 S1 分子的数目。

    照明一定时间后，单分子荧光以逐步方式下降到基线。

    当平台移动时，从扫描探针上的分子发出的荧光点不动，而从盖玻片上的分子发出的荧光点跟着移动。
13. 如果没有 S1 被捕获，在盖玻片的不同位置重复此过程直到 S1 成功地被捕获。
14. 如果从荧光上看出不只 1 个 S1 分子被捕获（总测试次数中＜5%），换一个新的探针，重复该过程。

## 位移测量

确定单分子 S1 被捕获到探针尖端后，到盖玻片另一方块进行位移测量。

15. 将带有两个玻璃垫片（厚 1 mm）的盖玻片放在反应区的边缘。通过交换含有 ATP（通常浓度为 1 μmol/L）的 AB 溶液将 ATP 引入。

    这将减少蒸发和其他外部干扰。
16. 通过移动 *XYZ* 针平台将扫描探针插入到流动池使肌动蛋白束垂直于探针并处于视野中心。

    这使扫描探针沿肌动蛋白微丝前进。

17. 用 ISIT 摄像机观察，把扫描探针的尖端靠近肌动蛋白束。通过改变照明路径到透射光照明来建立位移测量的检测系统。调整 Obj2 的高度将 ZnO 晶须图像聚焦到分裂二极管。
18. 使用精细 $xy$ 轴和 $z$ 轴压电控制进行初步试验，使单分子 S1 和肌动蛋白束相互作用（见排疑解难）。

    这种相互作用可以通过扫描探针热波动的降低来鉴别。输出电压出现脉冲列显示肌动球蛋白的相互作用。发生这种情况时，停止压电控制开始录制扫描探针的位移。

## 排疑解难

**问题**：测量不到位移的步距。

［**步骤 18**］

**解决方法**：步距并不总是能观察到。大约只有观察到的位移总数目的 30%的上升阶段能看到步进运动。主要原因是速度太快（总位移的 50%）。降低温度可使 5.5 nm 的步距被鉴别出来，因为温度延长了步距之间的停留时间。

其余 20%的总位移，刚度增加不够（<0.5 pN/nm，在这种情况下扫描探针波动的均方根>3 nm），使 S/N 太低不足以分辨步距。为最大限度降低这一问题，使扫描探针位移达到平台后再测量刚度。

**问题**：探针对平台有飘移。

［**步骤 18**］

**解决方法**：鉴于肌动蛋白束中微丝的方向并不一致，探针对平台的漂移使得肌动蛋白微丝转移到另一根，有时改变了位移的主要方向。为制止漂移，需构建一个稳定的测量系统（Steffen et al. 2001）。最近我们开发了一个主动反馈系统，该系统使用 *XY* 压电平台可探测样本的目前位置，补偿由于漂移引起的位置变化。这种方法使单一肌动蛋白微丝的测量成为可能。一旦肌球蛋白与单一肌动蛋白微丝相互作用，作用可以持续一段相对长的时间。

## 参考文献


Capitanio M., Canepari M., Cacciafesta P., Lombardi V., Cicchi R., Maffei M., Pavone F.S., and Bottinelli R. 2006. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 87–92.

Finer J.T., Simmons R.M., and Spudich J.A. 1994. Single myosin mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368:** 113–119.

Funatsu T., Harada Y., Tokunaga M., Satio K., and Yanagida T. 1995. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* **374:** 555–559.

Ishijima A., Doi T., Sakurada K., and Yanagida T. 1991. Subpiconewton force fluctuations of actomyosin in vitro. *Nature* **352:** 301–306.

Ishijima A., Harada Y., Kojima H., Funatsu T., Higuchi H., and Yanagida T. 1994. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199:** 1057–1063.

Ishijima A., Kojima H., Higuchi H., Harada Y., Funatsu T., and Yanagida T. 1996. Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: Unitary steps and forces. *Biophys. J.* **70:** 383–400.

Ishijima A., Kojima H., Funatsu T., Tokunaga M., Higuchi H., Tanaka H., and Yanagida T. 1998. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* **92:** 161–171.

Jameson D.M. and Eccleston J.F. 1997. Fluorescent nucleotide analogs: Synthesis and applications. *Methods Enzymol.* **278:** 363–390.

Kishino A. and Yanagida T. 1988. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334:** 74–76.

Kitamura K., Tokunaga M., Iwane A.H., and Yanagida T. 1999. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature* **397:** 129–134.

Kitamura K., Tokunaga M., Esaki S., Iwane A.H., and Yanagida T. 2005. Mechanism of muscle contraction based on stochastic properties of single actomyosin motors observed in vitro. *Biophysics* **1:** 1–19.

Lymn R.W. and Taylor E.W. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10:** 4617–4624.

Molloy J.E., Burns J.E., Kendrick-Jones J., Tregear R.T., and White D.C.S. 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* **378:** 209–212.

Nishizaka T., Oiwa, K., Noji H., Kimura S., Muneyuki E., Yoshid M., and Kinosita K., Jr. 2004. Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 142–148.

Oiwa K., Jameson D.M., Croney J.C., Davis C.T., Eccleston J.F., and Anson M. 2003. The 2′-*O*- and 3′-*O*-Cy3-EDA-ATP(ADP) complexes with myosin subfragment-1 are spectroscopically distinct. *Biophys. J.* **84:** 634–642.

Oiwa K., Eccleston J.F., Anson M., Kikumoto M., Davis C.T., Reid G.P., Ferenczi M.A., Corrie J.E.T., Yamada A., Nakayama H., and Trentham D.R. 2000. Comparative single-molecule and ensemble myosin enzymology: Sulfoindocyanine ATP and ADP derivatives. *Biophys. J.* **78:** 3048–3071.

Okada T., Tanaka H., Iwane AH., Kitamura K., Ikebe M., and Yanagida T. 2007. The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354:** 379–384.

Ruff C., Furch M., Brenner B., Manstein D.J., and Meyhöfer E. 2001. Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat. Struct. Biol.* **8:** 226–229.

Steffen W., Smith D., Simmons R., and Sleep J. 2001. Mapping the actin filament with myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 14949–14954.

Svoboda K. and Block SM. 1994. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77:** 773–784.

Tokunaga M., Kitamura K., Saito K., Iwane A.H., and Yanagida T. 1997. Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235:** 47–53.

Vale R.D., Funatsu T., Pierce, D.W., Romberg, L., Harada Y., and Yanagida T. 1996. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules *Nature* **380:** 451–453.

van Dijk M.A., Kapitein L.C., van Mameren J., Schmidt C.F., and Peterman E.J.G. 2004. Combining optical trapping and single-molecule fluorescence spectroscopy: Enhanced photobleaching of fluorophores. *J. Phys. Chem. B* **108:** 6479–6484.

（朱丽君　罗建红 译）

# 第 16 章　采用磁阱技术的单分子研究

Timothée Lionnet[*]　**Jean-François Allemand**[*]　**Andrey Revyakin**[†]　**Terence R. Strick**[‡]
**Omar A. Saleh**[§]　**David Bensimon**[*]　**Vincent Croquette**[*]

[*] LPS, ENS, UMR 8550 CNRS, 75231 Paris Cedex 05, France;
[†] University of California, Berkeley, California 94720－3204;
[‡] Institut J. Monod, UMR 7592 CNRS, 75251 Paris Cedex 05, France;
[§] Materials Department and BMSE Program, University of California,
Santa Barbara, California 93106

## 摘要

近年来，对 DNA 和其他生物高聚物的研究和利用已经日趋完善。在这项叫做磁阱 (magnetic trap) 的技术中，单个的 DNA 分子 (single DNA) 一端被固定在玻璃表面，另一端固定在一个微珠 (microbead) 上。一组位置和旋转量可控制的小磁体操纵和旋转这个微珠。这提供了一种简单的伸展与弯曲分子的方法。这个系统可以允许使用或测量从 $10^{-3}$ pN 到大于 $10^{2}$ pN 不等的力。与其他技术相比，磁阱技术的优点在于它力的度量是绝对的，不需要用其他传感器进行校准。在本章，我们将会阐述磁阱技术的原理，以及它在 DNA 弹性特性的度量和 DNA 与蛋白质相互作用的研究中的应用。在这之后，我们将给出一个建立和应用磁阱的实验操作方案。

## 概述

在过去的 10 年中，许多可以操纵单个 DNA 和其他生物高聚物 (RNA、蛋白质等) 的新技术被开发出来。这些实验技术允许我们度量 DNA 的伸展弹性和弯曲弹性，从而展示 DNA 与蛋白质相互作用时关于 DNA 机械特性的一些重要性质。在本章，我们将把目光投向一种特殊的操作技术——磁阱技术。我们将简要阐述它的原理，然后再将它应用于度量 DNA 的弹性特性和 DNA-蛋白质相互作用的研究中。之后，我们将给出一个更加详细的利用磁阱进行单分子研究的操作方案。

当 1953 年 Watson 和 Crick 提出他们著名的 DNA 分子双螺旋结构 (Watson and Crick 1953b) 的时候，基因遗传 (Avery et al. 1944; Hershey and Chase 1952) 已被广泛接受。然而，Watson 和 Click 的伟大发现通过提供分子和结构的基础，深刻地改变了科学家们对一些细胞内过程的认识，如 DNA 分子复制 (Watson and Crick 1953a) 和细胞分裂过程。从那时起，很显然对 DNA 分子在细胞中的相互作用的研究对于探索它的功能来说，是必不可少的。在发现双螺旋结构之后的 50 年中，涌现出了一大批可以对 DNA 进行转化、合成、测序的技术和一些可以研究和量化生物分子相互作用 (如蛋白质-DNA 互作) 的技术。当 2003 年人类基因组测序计划完成的时候，我们达到了所谓的 "基因时代" 的顶峰。

与此同时，在过去的10年中，生物物理学家们发展了许多单分子纳米操作（nano-manipulation）技术（如光镊、原子力显微镜、磁阱）。这些技术已经可以监控不同生物多聚物受力的力学响应（mechanical response）。例如，对双链DNA（dsDNA）、单链DNA（ssDNA）、RNA以及蛋白质的力学响应。科学家们也根据荧光技术创建了很多光学方法，这些方法可以通过观察单个荧光团的信号（位置、位移、强度）来追踪生化反应过程。

从物理学的角度来看，对于单分子弹性的研究为经典的多聚物弹性模型（model of polymer elasticity）提供了一个理想的验证机会。它也使理论学家们更加关注现实的多聚物链上的相互作用（静电的、碱基配对的或自回避的）。从生物化学和结构的角度来看，单分子微操作技术使得在一个外加的机械应力的作用下研究蛋白质的活动成为可能。这种机械应力虽然是共同的，但是在生物体内可以引发不同的效果。例如，引起细胞核内DNA的压缩和超螺旋，引发细胞内迅速的囊泡转运，或者导致细胞膜上机械门控离子通道的激活。在单分子的研究中，对蛋白质-DNA、蛋白质-蛋白质之间相互作用的调制，特别强调在分子水平的张力和扭力的重要性。的确，蛋白质根据不同的构象周期性地行使它们的催化功能。这些构象上的转变常常是一个十分庞大和复杂的过程，所以它常常是限速的。应用一个辅助或者对抗的外力可以加快或减慢构象的变化从而影响整个催化过程。这种蛋白质分子对外力的反应为构象变化循环中的机械变形过程提供了信息。最后，以酶学测定为例，相对于检测酶蛋白群体平均活性（实际上，其中的一些可能是没有活性的）的集合式实验而言，单分子技术则可以测定个体酶分子活性的分布情况，也可以采用外力和三磷酸核苷酸（如ATP）浓度的函数对单个酶（single enzyme）的反应速率、持续性（processivity）、分步活性大小进行测量。这些研究为构象变化循环中的限速步骤提供了很多详细的信息。

在本章，我们把焦点放在其中的一种操作技术——磁阱技术上。我们将简要地描绘这种技术在对DNA分子张力和扭力的研究以及在DNA-蛋白质相互作用（拓扑异构酶、DNA和RNA聚合酶、解旋酶、转移酶等）的探究中的应用。之后我们将描述怎样构建一个磁阱系统并给出一个研究蛋白质-DNA互相作用的经典实验方案。

## 磁阱技术中的物理学原理

蛋白质-DNA相互作用常常通过弯曲、伸长、扭转或者碱基修饰导致DNA结构和构象的改变。当一个外加的拉力使DNA分子伸长而导致这种改变时，DNA分子往往会在端-端伸展（end-end extension）上产生一些可被检测到的变化。DNA微操作技术通过施加一个外力到DNA分子上，进而进行对DNA分子轮廓高时空分辨率的测量。

为了监控酶学活性，DNA微操作技术理所应当地应在特定盐浓度的水溶液中进行。在这些环境下，最佳的观察技术是利用光学显微镜。然而由于以下两个原因还是不能实现直接观察DNA轮廓的可视变化。第一，单个DNA分子太小以至于不能有效地使光散射，所以在传统的光学显微镜下是不可见的。另外，因为衍射极限的限制，荧光成像也比较困难。第二，布朗运动（Brownian fluctuation）进一步使分子图像变得模糊。为了抵挡分辨率的降低，一种简单的方法是在DNA分子的一端加上一个足够大能在光学

显微镜下显现的标志物（marker）。为了抵消布朗运动的效果，我们对分子施加一个拉伸的力。这两个条件可以通过把 DNA 分子的一段固定在一个标志物（通称是一个微米级的小珠）上，另一端固定在一个固体的表面上如玻片上来实现。

为了拉伸和旋转 DNA 分子以研究它与蛋白质之间的相互作用，磁阱技术（Stick et al. 1996）显得格外便捷（Ali et al. 2001；Danilowicz et al. 2003；Leuba et al. 2003；Dawid et al. 2004；Fulconis et al. 2004；Seidel et al. 2004；Yan et al. 2004；Koster et al. 2005；Gore et al. 2005）。其他技术也可以应用于扭转 DNA 分子（Friese et al. 1996, 1998；Nieminen et al. 2001；Bryant et al. 2003；La Porda and Wang 2004），不过它们要复杂得多。简要地说，磁阱过程包括把 DNA 分子一段固定在玻璃表面上，另一端固定在一个磁性微珠（magnetic microbead）（直径 0.5～4.5 μm）上（图 16-1A），一组位置和旋转量可控的小磁体用来移动和转动微珠，从而伸展和弯曲 DNA 分子。这个系统使用并度量从几飞牛（$10^{-3}$ pN）到大于 100 pN（Strick et al. 1998）的力，相对精确度可以达到 10%左右。与其他技术相比，这种技术中力的度量是绝对的，不需要其他感受器校准。基于对受牵制微珠（tethered bead）布朗运动的分析，我们可以把这个体系看做一个长度 $l=\langle z\rangle$ 受磁力 $F$（延 $\langle z\rangle$ 轴方向）的阻尼振动。而由于受力产生了一个横向的回复力（restoring force），这个回复力等价于弹性系数 $k_x=F/\langle z\rangle$（Yan et al. 2004）。再加上磁力，微珠就又受到了一个随机兰格力（Langevin force）$F_L(t)$（它代表布朗运动的波动特性）和一个摩擦力 $F_r=\gamma\eta r$（如果半径为 $r$ 的球远离液体表面 $\gamma=6\pi$，水的黏滞性 $\eta=10^{-3}$ MKS）。那么，微粒的横向运动方程如下：

$$k_x x(t)+\gamma\eta r\frac{\partial x}{\partial t}=F_L(t) \tag{1}$$

因为整个系统是过阻尼的（overdamped），惯性很小，故可以忽略。由于下面的性质，随机兰格力可以被当作白噪声（white noise）处理：$\langle F_L(t)\rangle=0$ 和 $\langle F_L(t)F_L(t')\rangle=4k_B T\gamma\eta r\delta(t-t')$。在傅里叶空间，方程可以转化为（Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004）

$$k_x\tilde{x}(f)+2\pi\gamma\eta r j f\tilde{x}(f)=\tilde{F}_L(f) \tag{2}$$

式中，$f$、$\tilde{x}(f)$、$\tilde{F}_L(f)$分别代表频率、$x(f)$和 $F_L(f)$的傅里叶变换。注意我们研究的是以赫兹为单位的频率，如果涉及径向振动频率（radial frequency）ω，这个公式就需要进行变换。在频率空间，横向振动（transverse fluctuation）的密度［如横向振动的单侧功率谱（Bracewell 1999）］可以由以下公式求出：

$$|\tilde{x}(f)|^2=\frac{4\gamma\eta r k_B T}{k_x^2}\frac{1}{1+\left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \tag{3}$$

式中，$f_c\equiv k_x/(2\pi\gamma\eta r)=F/(12\pi^2\eta r\langle z\rangle)$。这种功率谱为洛伦兹分布，与 $\eta$ 和 $r$ 成正比。这个振动的功率谱是否能变成一个洛伦兹分布，决定于两个参数：功率谱和截止频率（cutoff frequency）$f_c$ 的积分。截止频率 $f_c$ 使得系统的特征响应时间 $\tau_b\equiv(2\pi f_c)^{-1}$。根据能量均分定理（Einstein 1956；Reif 1965），功率谱的积分等于 $k_B T\langle z\rangle/F$。这样，我们只需知道连着 DNA 的微珠的平均伸长量 $\langle z\rangle$，而不用去对难以精确测量的 $\eta$ 和 $r$ 进行假设，就可以对 $F$ 进行估计。

因为系统的特征响应时间为 $\tau_b$，我们必须注意：①正确选择样本信号（如采用与 $\tau_b$

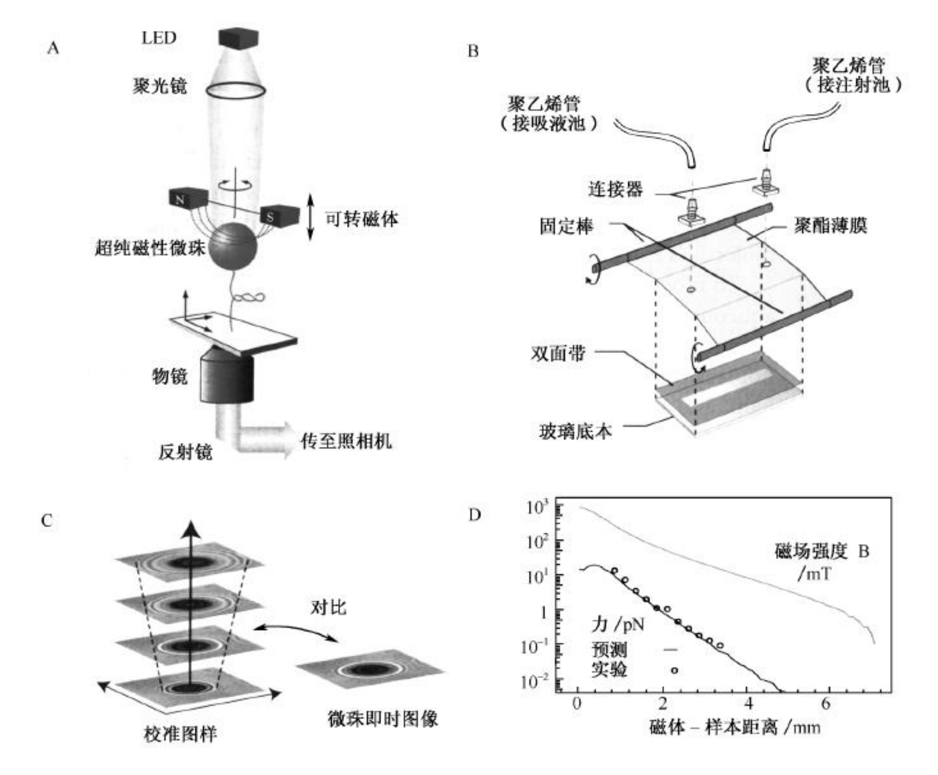



图 16-1　实验装置。A. 实验装置图示（非实际比例）。B. 微反应槽的设计。C. 微珠 $z$ 位置测量原理。每次即时微珠成像回合校正图像对比（见正文）。D. 文中电磁设备产生的磁场（灰线）的实验度量。利用公司的磁化数据（黑圈）对直径 1 μm 的微珠（MyOne; Dynal）所受合力进行预测。相似微珠（黑线）的受力用文中所述的方法进行测量。

关联很小的信号取样周期 $t_s \equiv 1/f_s$）；②在足够长的时间 $T$（如 $T \gg \tau_b$）里获取数据。在实际应用中，取样周期是由记录仪器来调控的（在这种情况下，照相机在 60 Hz 下工作）。如果 $f_s > 4f_c$，基于对功率谱积分的方法并不是特别有效。如果当 $f_s < f_c$，由于照相设备的信号混淆且数据被过滤，微珠实际的振动会明显地减少，从而导致对力的大小的估计过大，因此这种情况下，这个方法也不可行。综合以上因素，在傅里叶空间可行的关系范围应在 $f_s > 2f_c$ 时（Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004)。在满足功率谱后，我们还需要在傅里叶空间中选取合适数据的平均值［如封闭（blocking)］（Press et al. 1992; Berg-Sorensen and Flyvbjerg 2004)。大体上可以用一个简单的经验公式 $\sqrt{\tau_b/T}$（Strick et al. 1998）来检验利用布朗运动进行测量的相对精确度。

根据微珠的布朗运动 $\langle \delta x^2, \delta y^2 \rangle$，我们可以求出加在 DNA 分子上的力（振动越小，表明力 $F$ 越大），而且从 $\delta z^2$ 中，我们可以求出这个力的一阶导数 $\partial_z F$。用这种方法测量时可以利用磁阱（但不能利用光阱），因为磁阱的场强强度的数量级（$O$［1 mm］）远大于分子弹性变化的数量级（$O$［0.1 μm］）。换句话说，磁阱技术的设计属于恒力设计（磁体的位置也是固定的）。利用悬臂或者光镊在恒力下工作需要适当的反馈系统来

确定感受器的位移是恒定的（这样力才能恒定）。然而，因为有效刚度受力的影响，磁阱技术在力很小时（ $F<1$ pN）需要一个很漫长的响应时间。所以，虽然用它测量一个很小的力很方便，但是却需要很长的一段时间。

最后，恒力磁阱并不是磁镊唯一能应用的方面。它加载一个基于电磁学的反馈系统还可以制成一种恒定位置的磁阱（Gosse and Croquette 2002），它在磁镊中加载了一个类似于光镊的设备（除了反馈系统的时间响应部分）。不管是用光镊还是磁镊，都可以对 DNA 分子进行旋转（Friese et al. 1996，1998；Strick et al. 1996；Leger et al. 1999；Nieminen et al. 2001；Bryant et al. 2003；La Porta and Wang 2004）。光镊特殊设计的好处在于它可以直接测量加载在该分子上的扭力（La Porta and Wang 2004）；而磁镊是不能实现的。然而，用光镊旋转 DNA 分子还是一项相当复杂的实验技术，磁阱只要很简单的设备就可以实现这些目的：旋转磁性微珠只要用马达旋转磁体便可以完成了。

## 建立一个磁阱：设备概览

### 磁阱的设计和性质

建立一个磁阱的设备由一个倒置显微镜组成，在样品上方很近的地方固定一对强磁体。两个 NdFeB 立方磁体被异极相对固定起来，中间留出一个 0.5～1 mm 的间隙。这种结构能在磁体间隙中产生一个非常强烈（约 1 T）的平行磁场。磁体在光轴（纵向轴）中间，使光束可以通过间隙。在间隙之外，沿着光轴方向，磁场依旧是平行的，随着纵向的延伸，场强急速减弱（图 16-1D）。

磁场的存在导致了固定在样本上的超顺磁微珠的磁化。微珠的力矩顺应磁场方向（如横向）。但是，施加在微珠上的磁力的方向是沿着磁场梯度的方向（如竖直向上）的。实践中，我们发现力的强度随着微珠与磁场之间的纵向距离大致地成指数增长（图 16-1D）。它的特征衰变长度由两块磁体间的间隙大小决定，一般在 0.5 mm 左右。应用在微珠上的力的大小可以通过垂直调整磁体来改变。这可以通过电动移位平台（Polytec PI M126.PD）来实现。在一个典型的微操作实验中，固着在 DNA 分子上的微珠可以被移动数微米。超过这个限度，伸展的力只在 0.1%内波动，可以认为是恒力。

因为顺磁性的微珠磁性特性在各个方向都有差异，在磁场中的微珠趋向于顺应一个最适的方向，就像指南针一样。应用另一个马达（Polytec PI C-150.PD），这组磁体可以沿着光轴方向旋转。在这个过程中，施加在微珠上的力保持不变，但是微珠向磁场方向旋转。旋转的速度可以达到每秒 10 圈。磁体施加在微珠上的最大的转矩虽然随着力的变化而变化，但是都是比较大的，大约在 1000 pN・nm。令人高兴的是，DNA 分子上的弹性扭矩可以忽略，并且微珠磁力矩恰巧是沿着磁场方向的。

### 纳米分辨率显示微珠三维空间位置

大多数磁镊的应用需要对分子的伸长量进行测量，这就要明确微珠的垂直位置。一种方便的解决方法是利用微珠产生的衍射（talbot）图像（Ovryn 2000；Ovryn and Izen 2000）。一个相对单光源［超亮 LCD 是一个很好的选择（如 625 nm 波长超量白光）］发出的微小变焦发光束会导致样本发出近平行光。光从样本的上部发出，直接可以利用油

镜观察（Olympus 100×，NA＝1.2）。从物镜透过的光被一个绝缘体反射镜反射，通过一个 200 nm 透镜传到在 60 Hz 下工作的 JAICV-M30 照相机上（图 16-1A）。然后，照相信号通过帧收集器（Corecco PCVision＋）处理。图像可通过计算机实时进行分析。

在这种发光情况下，微珠图像被一系列衍射环环绕，这些衍射环的形状取决于微珠和焦平面的相对距离（图 16-1C）。当微珠在焦点上时，那些衍射环就会消失，但是当它们远离焦距时，衍射环的直径会相应变大。通过精确地逐步改变一系列位置的焦平面（如通过一个压电装置移动物镜），它会形成一组校准图样，这些校准图样可以记录与离焦平面相对的衍射环的形状。然后，用一个传统软件（我们接下来会提到）可以通过用一个新的衍射图样与校准图样相对比来计算出它到焦点的距离。

追踪的计算（Gosse and Croquette 2002）过程包括两个步骤。第一，我们计算出微珠中心的坐标 $x$ 和 $y$；然后，从这个位置开始，我们计算出图像的平均辐射密度分布图从而求出 $z$ 的坐标。对微珠 $x$、$y$ 坐标的确定是不受控制的，只要满足两个假设：第一，微珠必须是中心对称的；第二，微珠至多在两帧间移动几像素。为了确定 $x$ 的位置，我们提取出微珠图像边界部分的密度断面 $I(x)$，然后在 $y$ 的几像素中取平均值。$I(x)$在上一帧中 $x$ 的位置的正中。然后我们再利用快速傅里叶算法计算相关函数 $C(x_0)\equiv\int I(x)I(-x+x_0)\mathrm{d}x$。$C(x_0)$ 的极大值显示了 $\delta x$ 的位置，这个位置 2 倍于微珠位置与图像中心的移动。相机一个像素大概相当于 100 nm，所以这种对 $x$ 的精确测量需要像素以下的分辨率，它可以通过多项式内插法和适度低通过滤来实现。同样的方法也可以用来寻找 $y$ 的中心。

知道了微珠横向的位置，我们可以计算出图像径断面 $I_u(r)$，其中 $r$ 的径向坐标从微珠的中心开始测量，并且 $I_u(r)$ 是从各个角度取的平均值。这部分的公式很简单，却包含了 $10^4$ 个平方根运算，所以是最费时的一步。我们排除中间区域微珠的图像，这样我们就可以只考虑衍射环的图像［$I_u(r>r_c)$］了。$r_c$ 的值以经验来估计，这样可以去除中间的一些图像，这些图像随着焦平面到微珠的距离呈现多种复杂的光密度的变化。我们用最小二乘法把衍射图样和标准图样进行比较后（典型地通常在 10 μm 内取 32 个截面），我们发现可以把干涉图样看成是一个波包 $I_u(r)$。在这个过程当中，我们很容易分辨出与校准图样 $I_n(r)$ 最近的断面。这就可以粗略地估计出 $z$ 的位置（误差小于 0.33 μm）。为了获得 $z$ 的更高的分辨率，我们在校准图样的 $I_n(r)$ 和 $I_{n+1}(r)$ 之间插入 $I_u(r)$。它是通过对波包相差的处理而实现的。为了提取出所要的相位，我们对径向截面进行 Hilbert 变换。我们已经发现径向截面的相差随着 $z$ 的位置大致成线性变化。公式的执行时间取决于在截面中 $N$ 点个数的平方。如果 $N=128$，实行时间就是 1 ms。这个时间可以被三个 SIMD 指令中的一个因素所减少（Pentium IV，3 GHz）。

这种追踪方法也有它的局限：这些被追踪的微珠位置只限于有限范围的纵向位置（如校准图样的大小，大约 10 μm），并且限制微珠从一侧到焦平面的运动的记录。然而，它却提供了一个非常高的精确度：对一个 1 μm 直径固定在表面上的微珠 60Hz 的频率照相，追踪公式的不确定因素在 $x$、$y$、$z$ 三个方向上都仅有 1 nm 的误差。在开链的构型当中（如 DNA 的两条链被拉开），精确度取决于碱基对的开口。然而，在很多情

况下，实验的噪声更大程度地来自于黏着在分子上微珠的布朗运动。为了减少这样的噪声，我们可以增大施加的力，或者减少所用DNA分子的大小，或者减小微珠的大小。

### 超越微小波动：开发装置的潜能

典型地，所研究的酶可以使DNA分子产生几十纳米的伸长，该变化发生于几秒钟的活性脉冲区间，它们之间是几分钟的失活状态。不幸的是，目前市售显微镜没有针对这种目的进行设计，它们都有微小的移动。这种移位主要是由显微镜不同的组件在不同的环境温度中进行不同的热力学膨胀引起的。我们已经测出了温度变化1℃，显微镜物镜的焦点位置的移位基本上为1 μm。那么，一个0.01℃的温度变化可以导致计算DNA分子伸长时出现一个10 nm的误差。

一个简单的解决这种位移的方法是进行微分测量，例如，同时测量目的微珠和另外一个固定在微操作室表面上的微珠的位置。有些磁性微珠会无意中结合在表面上，从而可以做这种用途。或者，我们可以把无磁性的微珠用一个简单的实验操作（见下文）固定在表面上。减去微珠这两个轨迹可以除去大部分设备的移位。然而，大部分热学移位都发生在低频率的范围，微珠时间轨迹的高频率部分一般是由追踪噪声和低振幅布朗运动（如果这个微珠不是紧固的被固定的）组成的。因此，为了避免加上不必要的噪声，被固定微珠的时间轨迹应该在除去前把低的部分过滤。

单独的微分测量并不是一个很好的解决方案。首先，热学移位可能出现在给定微珠记录的校准图样上，这会影响微珠以后部分的测量。其次，在很长获取时间后的移位很容易超出校准图样的范围而造成追踪失败。因此，如果用可控制温度的显微镜，实验会变得更加简单；或者最好能用一个精心设计好的组件各方面的热学膨胀都一致的显微镜，这样无论任何温度，它们的移位都可以被抵消。

## DNA的准备和锚定

### 分子锚定，操作的先决条件

任何DNA分子操作的第一步都是把DNA分子的一端锚定在一个合适的被处理过的表面上（先于它的末端）。很多不同的实验方法可以实现对特定DNA分子的锚定。它们都被应用在一些很有用的地方，从绘制基因图谱、测序、分析（Chee et al. 1996）到特别敏感的免疫化验（免疫PCR）（Sano et al. 1992）。第一种方法，它不需要对DNA分子做任何的修饰，只是根据在pH约为5.5的环境下，固定在疏水表面DNA分子特殊的吸附作用而实现的（Allemand et al. 1997）。DNA被发现在低pH时与许多疏水材料（聚四氟乙烯、聚苯乙烯、石墨、硅烷化玻璃）非特异地紧密结合，而在高pH时却疏松结合甚至不结合。在这两种情况中间，存在一个很窄的范围（pH = 5.5 ± 0.2）使得DNA一端结合在表面上。令人惊讶的是，一旦DNA结合在表面上，即使改变pH，DNA仍旧保持锚定状态。这种方法被用来以光镊固定和锚定DNA（Shivashakar et al. 1999）。

第二种方法基于对末端反应基团（第一个或第二个氨基、羧基或巯基）修饰过的DNA可以被锚定在相应的表面上（如羧基、氨基或金）的事实而设计的（Lee et

al. 1994；Yang et al. 1998)。相似地，表面周围的寡核苷酸可以识别目的 DNA 的另一个末端。然而，大多数应用都必须有特异性的生化反应结合位点在 DNA 分子末端标记一个官能团（生物素、荧光素、毛地黄毒苷），然后把表面用合适的物质包被［例如，链霉亲和素可以结合生物素，抗体可以结合荧光素和毛地黄毒苷等（Smith et al. 1992)］。另外，如果想要旋转 DNA，DNA 分子的两端必须通过不同的连接结合到适合的表面。本章后面的实验方案介绍了一种简单实现 DNA 分子末端标记的方法。需要注意的是，DNA 末端标记还有多种方法，而且这些方法并不只是为磁镊实验设计的，它还可以用于很多其他显微操作当中。举例来说，同样的方法还可以用于光镊（见第 14 章)。

## 表面的功能化过程

大多数用于磁阱实验的磁性微珠很容易购买，它购买时就用链霉亲和素包被，可以直接使用。我们在本节中介绍用毛地黄毒苷抗体结合到表面的方法。其实，很多实验都可以成功地实现这个过程。一些是基于特殊功能的玻璃表面与抗体氨基或羧基反应来实现此过程的。一种简单有效的方法是利用疏水表面对抗体的吸引（如在 ELISA 里)。不管用哪一种方法，抗体结合必须在钝化过程之后，这样可以避免 DNA 、蛋白质、微珠与表面之间的非特异性结合。尽管还有其他实验方法存在，但是后面将要给出的实验方案已经成功地应用在对 DNA 弹性（Lionnet et al. 2006）和 DNA-蛋白质相互作用(Saleh et al. 2005）的研究中。

**微操作室的设计**

因为两个因素，我们应选极可能小的微操作室：第一，这样节约实验空间。第二，微小的操作空间允许磁体更加充分地接触样本（约 100 μm)，使样本中的磁场强度更大。这样，我们可以对微珠施加更大的力，或者不需要很大的力时，我们可以用更加小的微珠，从而减少布朗运动，提高信号与噪声的比值，延长微珠-DNA 系统的特征响应时间。具体在磁镊实验中怎样构建一个微操作室，包括抗体结合、钝化等步骤，详见实验方案 1。应用这样的构造，样本与磁体的距离最小可以达到 100 μm。这样，系统可以对 1 μm 直径的微珠提供 15 pN 的力（MyOne；Dynal)。

**表面处理**

在建成微操作室之前，载玻片在氯化多聚硅酸盐的庚烷溶液中处理，使之疏水化(Sigmacote；Sigma-Aldrich)。然后将疏水化的载玻片装入微操作室。为了使毛地黄毒苷抗体结合到表面，我们把载玻片放在盛有毛地黄毒苷抗体溶液的微操作室中孵育。最后，我们在微室中换入钝化溶液孵育 2～4 h 来阻止表面的非特异性结合。

## 制备 DNA 的原则

第一步是选择所要的 DNA 序列，这种序列的长度可以在几十个碱基对到几万个碱基对。一般来说，主要的 DNA 片段应该是包含两个限制酶位点的质粒的一部分。足够的 DNA（一天的单分子操作需要几毫升 10～100 pmol/L 的 DNA 溶液）可以通过 DNA 小量制备或者对含有目的片段并且两端各有一个限制位点的质粒进行 PCR 获得，DNA 从两个限制位点切割下来，然后把含有目的片段的 DNA 从产物中分离出来［凝

胶回收（尽量减少在紫外线下的照射时间以免引起 DNA 损伤），或者通过纯化柱]。限制性内切核酸酶需要能切开黏性末端，并且黏性末端越长，GC 含量越高越好，这样可以增加切下来片段的黏性强度。

因为操作需要，中心的 DNA 片段需要与两个锚定的 DNA 片段相连。这需要有几百个碱基对的长度。每个被锚定的 DNA 分子必须含有一个暴露的黏性末端可以与对应中心 DNA 片段末端相连。这里还需要排除任何对所要研究的蛋白质有干扰的 DNA 序列。锚定片段由两个独立的 PCR 产生。标记是通过在 PCR 中标准的 dNTP 中加入含有适合标记的 dUTP 片段（如毛地黄毒苷-dUTP、生物素-dUTP）。标记的核苷酸与标准核苷酸的比值通常为 1∶10～1∶4。然后将 PCR 产物纯化以除去内含的残留引物和其他反应物。在最后一步的时候，由于限制性内切核酸酶提供的相同的黏性末端，我们可以利用 DNA 连接酶将锚定的 DNA 片段与中间的 DNA 片段进行连接。为了提高连接后的产量，剩余的锚定片段应过量（如 4～10 倍于中间片段）使中间的片段充分地被连接。

最后得到的 DNA 先在试管中与微珠混合，混合的比例按照每个 DNA 分子对应 10 个微珠（如果使每个微珠结合两个 DNA 分子，该比例应减少，如在 DNA 成辫实验中）。这样保证在统计学上一个 DNA 分子至多结合上一个微珠。在简单地孵育之后，微珠-DNA 混合物被注入磁镊设备。在缺乏磁力的状态下，微珠可以在毛地黄毒苷抗体包被的玻片上沉积几分钟。自由的微珠会被一个温和的水流冲洗掉。最后，施加磁力，我们就可以看到具有被固定的微珠的表面了。更加详细的操作方案可以参考后面的方案或者参阅 Revyakin 等（2005）。

一些技巧可以在条件允许时用，但不是必须做的。为了限制一些影响限制性内切核酸酶和标记碱基的因素的影响，我们可以应用只含 G 或 C 的限制性位点或者用 PCR 引物来简化切开的位点。为了减少在连接以后许多不需要的物质，非回文限制酶（它消化的产物不会自连）是最佳选择。对连接产物的完全纯化（例如，在用回文的限制酶时除去连接产物中生物素-生物素的片段）常常是不必要的，因为只有连接了毛地黄毒苷和生物素两种末端的 DNA 产物才能特异地与表面和微珠相连。

**多种 DNA 作用位点可以应用在磁阱中**

在细胞中，一些酶可以作用在 dsDNA 上，而不需要有特定的序列（如拓扑异构酶只需要特定的超螺旋状态）。然而，许多酶对 DNA 的作用必须存在一定的 DNA 序列或作用位点。举例来说，RNA 聚合酶特异性识别基因前端的启动子并与之结合，而 DNA 聚合酶仅在 ssDNA 和 dsDNA 的中间与之结合。另外，解旋酶可以分离双链 DNA 的两条链形成复制叉结构。DNA 的再结合形成了一个暂时的四链连接处，这就是所谓的 Holliday 连接点。所有这些情况都可以应用磁阱进行研究。在下文中，我们会简要地介绍怎样准备这些作用位点。

**双链 DNA（dsDNA）模板**

这里所说的模板就是我们在前文中刚刚提到的。它的一端标记了生物素，另一端固定了毛地黄毒苷。尽管单个的生物素可以拉伸单分子，但是强制旋转 DNA 分子需要多个生物素和毛地黄毒苷标记。此外，这样的标记保证它可以强烈地结合在表面，延长了锚定 DNA 分子的使用寿命。

中间 DNA 片段的正确选择对于研究识别特异性 DNA 序列的酶来说是至关重要的。

应用正确的序列，我们可以研究 DNA 成环酶（DNA looping enzyme）；进一步来说，这些酶可以调节基因［LacI 或 GalR（Lia et al. 2003）］或者切除 DNA（CRE）。精心设计的中心 DNA 片段甚至可以用来研究非常精细的作用位点：如果中心 DNA 片段有一个很长的回文序列在里面，当不期望的超螺旋在分子中被引发时，Holliday 连接点就产生了。对这种 DNA 分子的更进一步阐述请见 Amit 等（2004）和 Dawid 等（2004）。

**单链 DNA（ssDNA）模板**

对适合显微操作实验的单链 DNA 结合位点的制备通常是从 dsDNA 溶液开始的（如前文所述）。在单分子实验开始前，我们先把 DNA 分子加热使其失活（通常 95℃ 5 min），然后迅速用冰浴的溶液稀释。这个过程限制了失活后的单链 DNA 再次变成双链的过程。得到的溶液和微珠混合后即可以注入磁镊设备进行下一步实验。对 ssDNA 作用位点的应用通常是非常繁琐的，因为单链 DNA 与双链 DNA 相比，更加趋向于非特异性结合。同样需要注意的是，这种方法并不能使研究者知道在研究的 DNA 片段是失活后两条单链中的哪一条。

**有明确几何学交叉的两个 dsDNA 分子**

如果我们增加 DNA 的量，用于磁阱实验的混合液中微珠的比例和两个 DNA 结合在同一微珠上的概率都会上升。虽然这都是我们极力所要避免的情况，但是这却对研究 DNA 交叉十分有利。当两个双链 DNA 分子结合在同一个微珠上的时候，它们会在一定距离上排斥，这样我们就可以旋转微珠使两个 DNA 分子以一个明确的角度交叉。我们进行一次旋转，两个分子就形成一个交叉；我们进行多组旋转，就可以让很多对 DNA 分子交织在一起。编制的几何形状显然不能被操纵者控制，因此，事前我们并不知道连接在表面和微珠上的两个分子锚定位点间分开的距离。但是，通过可以作为分子扭曲表征的分子伸长值的测量，我们可以推算出影响几何构型的一些因素。这是第二类拓扑异构酶经典的研究方法（Charvin et al. 2003，2005b）。

## 拉伸 DNA

一旦微珠结合到表面上，我们最好先检验一下它是否结合到单个 DNA 分子上。当磁体充分靠近样品时（如在几毫米之内），微珠可能被以下三种情形中的一种所牵制。

1. 因为非特异性结合，微珠黏着在表面上。这样的微珠可以作为表面移位的标志物。通过进行微分计算（例如，计算出结合在 DNA 分子上的微珠相对与黏附在表面上的微珠的位移），我们可以消除计算中包含的移位值。

2. 微珠没有固定在表面上；因为磁力吸引，微珠飞离表面。

3. 如果微珠因为与 DNA 结合而附着在表面上并受磁体牵制，那么它会悬在表面之上的一段距离中。

那些在离表面一定距离振动的微珠有可能是我们所需要的，这里面有可能结合了一个或者更多 DNA 分子。因此，下一步我们来检查微珠是否只结合了一个 DNA 分子。一种简单的方法是在微珠上施加一个很大的力（2～3 pN）旋转磁体数圈（50～100）。如果微珠结合了不止一个 DNA 分子，这些结合的 DNA 分子之间会互相交织从而使微珠到表面的距离减少。顺时针方向还是逆时针方向旋转，这种长度的变化是相似的。从

另一个角度来说，如果微珠只结合了一个 DNA 分子（除非它有缺刻），它离表面的距离将保持不变（如果 DNA 分子是不缺刻的，由于旋转时结构的变化，正转和反转会引起 DNA 在长度上微小的不均匀的变化，见下文）。

一种更加精确地检查一个微珠对应一个 DNA 的方法需要在不同力（$0<F<100$ pN）的作用下对分子的弹性响应进行测量。在这个范围内，单个 DNA 分子的弹性与所谓的蠕虫样链模型（图 16-2）（Bustamante et al. 1994；Marko and Siggia 1995）中理想多聚链的熵弹性非常吻合（Smith et al. 1992）。虽然不用去纠缠那些理论的细枝末节，但是我们不得不提一下这里存在一个非常有用的公式，它能令人满意地估算出作为力 $F$ 表征的 DNA 分子相对伸长量的变化$\frac{l}{l_0}$（这里 $l_0$ 表示分子原长）（Bouchiat et al. 1999）：

$$\frac{F\xi}{k_B T} = \frac{l}{l_0} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4\left(1-\frac{l}{l_0}\right)^2} + \sum_{i=2}^{7} a_i \left(\frac{l}{l_0}\right)^i \tag{4}$$

式中，$a_2=-0.516\,422\,8$；$a_3=-2.737\,418$；$a_4=16.074\,97$；$a_5=-38.876\,07$；$a_6=39.499\,44$；$a_7=-14.177\,18$；另外，$\xi=50$ 是 DNA 分子在平衡盐溶液中的长度。

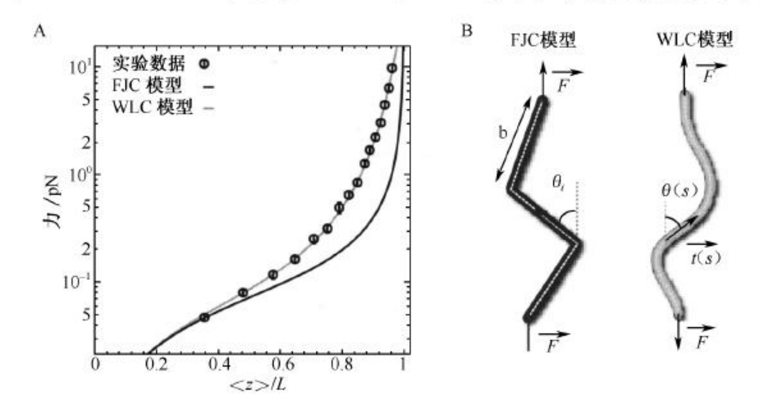



图 16-2　dsDNA 的力与伸长量和 DNA 的多聚物模型。A. 实验测得的 dsDNA 分子力与伸长量曲线（λ-DNA，长 16 μm；黑色圆圈）。另一条应用蠕虫样链模型（灰线）$\xi=51.6$ nm 和 $L_0=15.6$ μm。相对联合链式模型的图形也用同样的体积 $\xi$ 却明显地脱离了实验数据。B. 基于 FJC 和 WLC 模型的多聚物模型的原理（改自 Charvin et al. 2004）。

## 扭转 DNA

大多数的聚合物都对扭力很敏感，因为它们的单体都是靠单独的共价键连接的，这些单体很容易围绕共价键转动。当聚合物没有单共价键时，扭力减少，因而没有这种性质。没有裂口（就是其中的一条没有断开）的双螺旋 DNA 就是这种情况。这样独特的特点有非常重要的生物学意义。第一，从结构的观点上来看，扭曲的结构能有效地压紧 DNA 分子，使得它能容纳在细胞核中，这解释了为何在有机体内 DNA 分子都是扭曲的。第二，负螺旋的（欠旋）能够局部变性（就是两条链局部打开）。这简化了得到通

常“隐藏”在 DNA 分子单链中的基因信息的途径。双链的局部打开使 DNA 与一系列蛋白质（DNA 聚合酶、调节因子等）的相互影响变得容易。第三，双链结构的正螺旋 DNA 在高温线更加稳定（就是更少变性）。因此，生活在沸点附近的水中的嗜热菌中含有旋紧 DNA 的酶（反旋转酶）。因为 DNA 的拓扑结构在细胞生活中有相当重要的地位，自然进化出一系列酶，就是通常我们知道的拓扑异构酶（反旋转酶就是其中一种），用来控制 DNA 分子的扭曲和缠绕。

通过简单地旋转磁场使得 DNA 在磁阱装置中能够容易地被扭曲，这使得这套系统成为研究卷曲（和编织）的 DNA 和它与蛋白质的相互作用（如拓扑异构酶）的最好选择。尽管在这里我们的目的不是详述扭曲聚合物的形成机制，但大多数关于受到扭力的 DNA 分子的实验结果可以根据受力 $F$ 作用的绳子或管子的日常经验来推断。当这样一根管子开始受到扭曲时，它的张力最初是保持不变的，紧张状态储存为纯扭力。管子的力矩 $\Gamma$ 随扭转角度 $\Omega$ 线性增加：$\Gamma=(C/b)\Omega$，它的扭曲能量 2 次方增加：$E_{torsion}=(1/2)\cdot(C/b)\Omega^2$，式中 $C$ 为管子的扭曲硬挺度（通常在 DNA 背景下写作单位 $k_B T$：$C\equiv k_B TC'$）。继续扭曲管子，经过一个确定的转数 $n_b$（与力矩 $\Gamma_b$ 有关）后，整个系统扣环并形成一个半径为 $R$ 的圈。扭曲能量就这样被转化为弯曲能量。若继续扭曲，管子开始自己盘圈，但力矩并不增加（图 16-3B）。结果是，除了张力以外，整个系统的张力每转一圈，$Lk$ 减少 $2\pi R$。对扭曲能量和做的功以及弯曲能量的增量进行权衡，我们得到

$$2\pi\Gamma_b=2\pi RF+2\pi RB/2R^2 \tag{5}$$

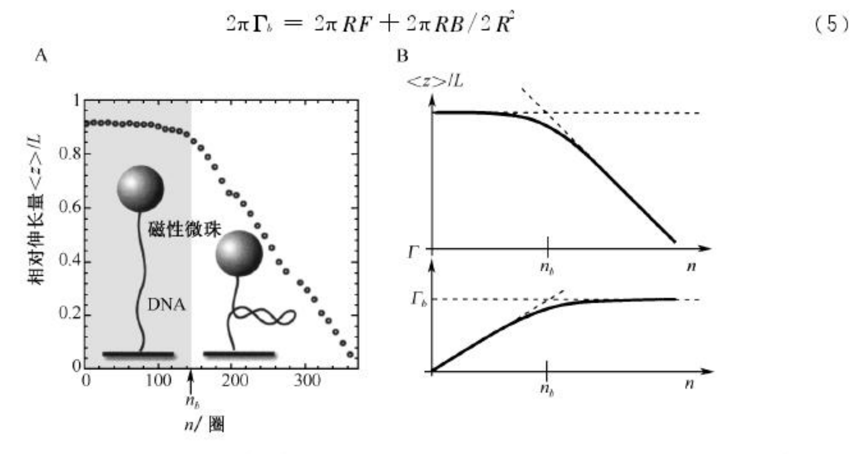



图 16-3　一个 dsDNA 的张力和超螺旋。A. 实验曲线（黑色圈）给出了规范化的张力 vs 单链 DNA 分子（50 kb）$F=1.2$ pN 下的 $\sigma$ 行为。我们区分出两种状态：当 $n$ 低时，DNA 张力大小的改变很小，而是分子储存扭曲能量。当 $n=n_b\approx140$ 时，分子开始弯曲并形成螺旋。旋转结束以后，张力随扭曲的增加而减少。B. 因为可以看做一个伸缩的橡胶管，最初的扭力并没有增加系统的张力，但力矩贮存在管子中，管子贮存的力矩随转数的增加而线性增加。当给定 $n=n_b$ 时，形成一个圈耗能少并且增加了扭转能量。任何一个附加的圈导致形成另外一个圈，所以张力随 $n$ 线性减小，但是力矩 $\Gamma=\Gamma_b$ 保持不变（摘自 Charvin et al. 2004）。

使得弯曲能量最小的半径是 $R=\sqrt{B/2F}$，所以 $\Gamma_b=\sqrt{B/2F}$，$n_b=L\sqrt{2BF}/(2\pi C)$。因此，力越大，弯曲的力矩 $\Gamma_b$ 和转的圈数 $n_b$ 越大，圈的半径越小，进一步扭曲，管子将绕自己旋转，但是力矩 $\Gamma$ 不再增加。这个简单的模型在量上描述了 DNA 受

到扭力时的行为。因为热量的波动，弯曲的过渡并不是像宏观想象中的尖锐地转变，但若是增加作用力的大小将会使过渡变得更加明显。另外，在弯曲过渡以后，DNA 的张力随旋转圈数的增加而减小，因为分子中加入了更多的圈数而力矩没有变化。

随着 DNA 分子中张力的增加，用于弯曲的力矩增加。张力可能会很大以至于双螺旋链不靠弯曲来增加它的力矩，而是改变它的内部结构。我们发现两种结构上的转变。在负力矩 [$\Gamma_d$ 约为−9 pN · nm (Strick et al. 1999; Bryant et al. 2003)] 作用下，DNA 变性。正力矩 [$\Gamma_p$ 为精确的 34 pN · nm (Bryant et al. 2003)] 导致局部形态形成一个新的 DNA 结构，叫做 *P*-DNA (Allemand et al. 1998)，比 DNA 有更小的斜度（大约 2.6 bp每一圈）。这种结构的特点是弯曲的磷酸基在双螺旋链中间成为支架，碱基暴露在外侧的溶液之中。

一个简单的拓扑形成论概括了上述的讨论。DNA 拓扑学通常描述为三个参数：圈数 *Tw*、拧数 *Wr* 和连接数 *Lk*。扭转数衡量的是两条链相互缠绕的总次数，通常未变形的 B-DNA 每 10.5 bp 一圈。拧数衡量的是相缠螺旋自己缠绕的总次数。连接数是圈数和拧数的总和：$Lk = Tw + Wr$。为了在拓扑学上束缚 DNA，控制 *Lk* 是一个常数并且以 *Tw* 和 *Wr* 的重新分配来控制弯曲的力矩大小。在弯曲过渡以后，在生理条件下，即 pH 约 8、盐浓度约 150 mmol/L、温度约 37℃、力约 0.5 pN、超螺旋约 5%，一个单位的 *Wr* 的改变，将导致一个大的、δ约 50 nm 的 DNA 中张力的改变。如果 *Tw* 和 *Wr* 在固定大小的 *Lk* 下重新平衡，则 DNA 中 *Tw* 的变量与 *Wr* 改变大小相等符号相反。因此一个单位 *Wr* 的改变将导致 DNA 分子张力很大的改变，*Tw* 只有约 10 bp（或 3 nm）一个单位的改变，可以导致约 50 nm 的 DNA 张力上的改变。

## 利用磁阱来检测 DNA-蛋白质相互作用

磁阱已经被用来研究带在固定力和给定的缠绕或扭曲下，蛋白质与 1 或 2 个 DNA 分子之间的相互作用。这些实验的本质都是实时监测蛋白质作用于 DNA 时 DNA 张力的变化（微珠离平面的距离）。这些变化可能是由于分子的弯折或扭曲 [如 ATP 中 TopoIV 的消失 (Charvin et al. 2005a)]、DNA 环的构成 (Lia et al. 2006)、DNA 的置换 (Smith et al. 2000; Dawid et al. 2004; Saleh et al. 2004; Lia et al. 2006)、超螺旋或扭曲结构的松散 Strick et al. 2000; Charvin et al. 2005b; Koster et al. 2005)、DNA 的解旋 (Dessinges et al. 2004)、新 DNA 链的合成 (Maier et al. 2000) 等。

特别值得注意的是，磁阱近期的一些在机械学上对细菌 RNA 聚合酶 (RNAP) 研究的应用 (Revyakin et al. 2005, 2006)。当 RNAP 与基因上游的启动子结合时，它可逆地与一段约 13 bp 的 DNA 解链（比双螺旋的一圈多一点）来形成一个 RNAP-启动子开环复合体 (RPo)。当在 DNA 分子上的负超螺旋这个复合物出现在磁阱装置中时（图 16-4 A～C），其中一个负超螺旋将被除去并且溶解，导致伸长至约 60 nm 的分子中的张力增加。如果这个 DNA 是正超螺旋，当加入负超螺旋时，启动子溶解，导致伸长至约 60 nm 的分子中的张力减小（图 16-4 B、D）。这种 DNA 分子张力的相对变化很容易被检测出来，并且可以通过大约 1 s 时间间隔内信号的平均值来实时测量单一碱基分辨率下的 DNA 分子的解链的变化。而且，在负超螺旋和正超螺旋中观察到的 DNA 分子

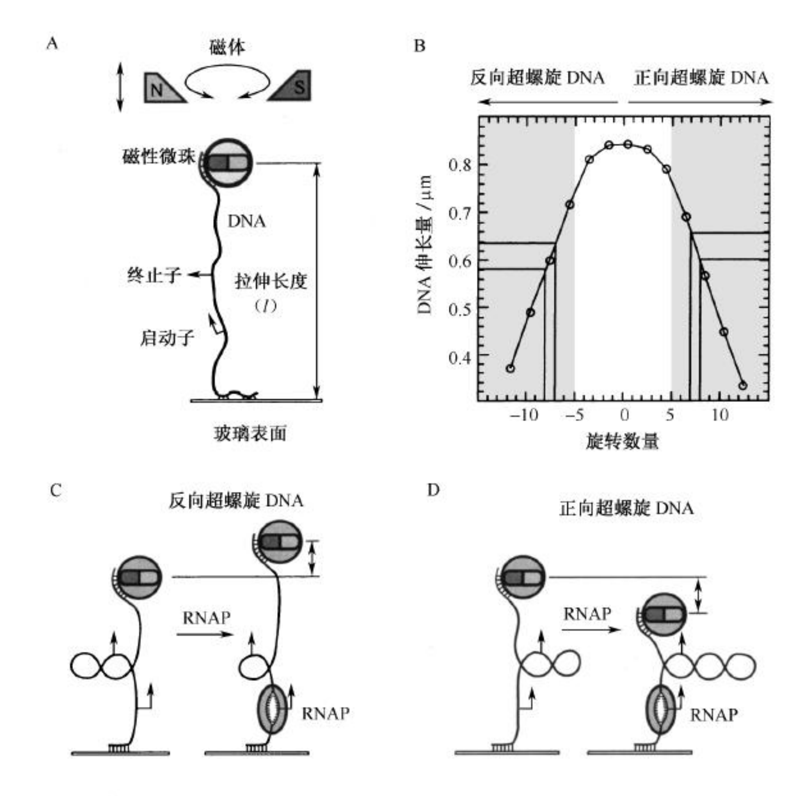



图 16-4 用单个 RNAP 分子检测启动子解链的原理。A. 线性分子，2 kb DNA，包含一个细菌启动子位点、一个转录区域和一个转录结束序列，被扭曲吸附在玻璃平面和一个磁力小珠之间。作用于纳米操纵的 DNA 上的力和旋转作用被样品上方转录和旋转的磁体控制。DNA 两端的张力通过测量表面上方的微珠的位置来计算。B. 张力-超螺旋圈数图，超螺旋圈数是在 34℃转录缓冲液（离子强度 150 mmol/L）中低张力（$F=0.3$ pN）下得到的。一旦 DNA 形成同向双股（plectoneme），它的张力在每改变一个正超螺旋或负超螺旋 $\delta=56$ nm 的速度下线性变化。C. 对于负超螺旋 DNA 而言，RNA 聚合酶引起的启动子解链导致了负超螺旋的解旋和 DNA 张力的增加。反向的力矩会驱使反应朝着开环复合体的状态进行。D. 对于正超螺旋而言，启动子的解链导致了正超螺旋的形成和 DNA 张力的减小。正的力矩会驱使反应朝着闭环复合体的状态进行。

张力的系统的变化可以归因于 DNA 的弯折，DNA 的弯折伴随着开环复合体的形成，在这样的分析中也能够被确定。

图 16-5 展示了在正超螺旋情况下，同感 *lac* 启动子的可逆性解链。当 DNA 处于低张力的位置时，启动子 DNA 在 RNAP 的作用下是松散的（RPo）。在高张力的位置，启动子 DNA 则保持其正常的形态，但它可能不受 RNAP 的影响或者被一个 RNAP 结合形成了一个启动子-RNAP 闭环复合体（RPc）。从中得到的特征性的电信号提供了被 RNAP 解链的启动子上的结构和动能信息。DNA 张力的变化与 RPo 中解链的碱基个数成正比，同时单一碱基分辨率可以从第二等级的信号的平均值得到；在这里，开环复合体中大约 13 bp 的碱基被解链。等待的时间 $T_{wait}$ 反映从游离的组分形成 RPo 的过程满足米氏（Michaelis-

Menten）方程，约一个结合常数（$K_B$ 约 100 $nM^{-1}$）和一个限速步骤（$k_f$ 约 0.3 s）。RPo 的寿命取决于它的热稳定性（对于一个 0.3 pN 的力作用的正超螺旋的 DNA，$k_f$ 约 0.03 s）。同时，这些参数提供了一系列确定启动子解链过程中一些分子的作用的精确的基准（聚阴离子、抗生素、受体核苷酸、起始核苷酸、转录因子等）。

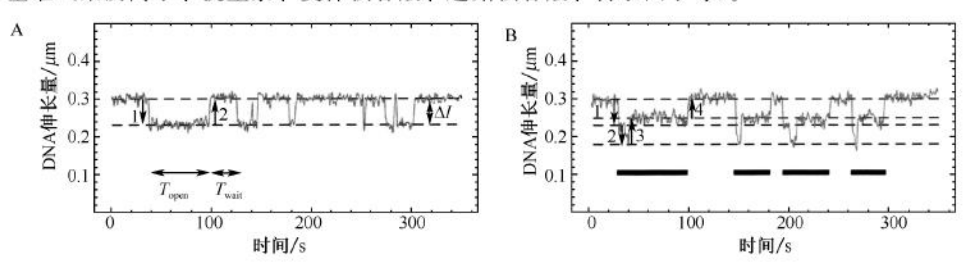



图 16-5　RNAP-DNA 相互作用的实时监测。A. 在没有核苷酸的情况下，正超螺旋 T5 N25 启动子的可逆解链出现了，因为 DNA 张力的电信号。DNA 张力变化的振幅 $\Delta I_{unwind}$ 和解链的碱基数 $n$ 有关，$n = \Delta I_{unwind} \times 10.5/56$。启动子解链的时间 $T_{unwind}$ 与解离速率成反比，$T_{unwind} = 1/k_{off}$，并且是一个很好的对开环启动子复合物的热稳定性的测量。成功解链的等待时间 $T_{wait}$ 和开环启动子复合物形成的速率成反比，$k_{open} = [RNAP]\, k_f / ([RNAP] + K_B)$。[RNAP] 滴定使得 $K_B$ 约 100 $nM^{-1}$，$k_f$ 约 1 s。B. 在核苷酸存在的情况下，RNAP 在启动子解链过程中的进程（转移 1）、起始转录（转移 2）、启动子脱离（转移 3）、产物延伸（从转移 3 至转移 4）和转录终止（转移 4）。转录起始（从转移 2 至转移 3）伴随着 DNA 解链的大程度增加（约 10 bp）。这个 DNA 的短暂解链（"挤压"）有 5 s 的寿命并且总在启动子脱离之前。核苷酸的水解在能量上造成了这个解链的增加，活化了复合体，使得 RNAP 能够断开与启动子的连接。

磁阱实验同样被用来描述基因转录成 RNA 的接下来的步骤，尤其是转录起始阶段 RNAP 从启动子上脱离的机制。在 4 种核苷酸（ATP、UTP、GTP、CTP）都存在的条件下，RNAP 形成 RPo 然后紧接着开始转录。然而，在最初 10～15 个核苷酸的转录过程中，RNAP 保持结合在启动子 DNA 上，导致了 RPo 的高度稳定性。RNAP 转录过程中首先卷入 DNA，然后在下游从链中脱离，而不是沿着 DNA 链移动。在 DNA 中 RPo 形成后紧接着的突然而短暂的某个 DNA 区域的解链看起来就像是 RNAP 对 DNA 产生了"挤压"(图 16-5 B)。双螺旋中大约一个额外的圈被解链。

互补单分子 FRET（fluorescence resonance energy transfer）实验证实了下游 DNA 在这个过程中移向了连接未旋转 DNA 与卷曲的下游 DNA 的 RNAP。并且，RNAP 启动子复合体被转录开始与 RNA 进行聚合反应的 10 bp 左右的 DNA 所激活。这部分积聚在受迫中间体中的能量（约 16 kcal/mol）足以导致 RNAP 从稳定开放的启动子上释放出来，继而发生基因的表达。对这个瞬时的受迫中间体（寿命约 5 s）进行动力学研究时发现，原来破坏的中间体形成之前，所有的启动子释放的事件就已经完成了。

在启动子逃离之前，转录小泡往往会变小。并且，RNAP 达到最快速率 $V_{max}$ 约 25 bp/s，转录与延伸都是随着只有 9 bp 的松散的转录小泡进行的。最后，在到达转录终点序列时，小泡最终关闭，显示全长的 RNA 与 RNAP 都已经从 DNA 上解离下来。同时，对转录开始时结构和功能进行的分析，启动子逃离，产物转录，以及转录终止都体现了科学家们对转录的激动剂与抑制剂功能的比较研究的强烈兴趣和激情。

# 实验方案 1：磁阱构建

本实验方案描述了一种构建适合磁镊研究的微操作室的方法，包括抗体包被和钝化。它还描述了一系列得到 DNA 锚定片段末端标记的简单步骤。一种锚定片段是生物素标记的，另一种是用毛地黄毒苷标记的。此后，锚定片段被消化下来并且连接到一个包含目的序列的中心 DNA 区域。生物素化 DNA 被吸附到链霉亲和素包被的磁性微珠上，同时这种 DNA-微珠混合物与微操作室的毛地黄毒苷抗体涂层表面特异结合。对另外一种特定的实验方案的例子，请参照 Revyakin 等（2003）。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标记有<!>的材料。

### 反应物

毛地黄毒苷抗体，多克隆（PBS 溶解毛地黄毒苷抗体到终浓度为 100 μg/ml；Roche）

牛血清白蛋白（BSA；Promega）

生物素-16-dUTP（1 mmol/L；Roche）

毛地黄毒苷-11-dUTP（1 mmol/L）<!>

4 种 dNTP（10 mmol/L）

10×连接酶缓冲液

$Mg^{2+}$（25 mmol/L）<!>

NaOH（5 mol/L）<!>

NEB4（New England Biolab）

钝化缓冲液（Passivation Buffer）

- 10 mg/ml BSA
- 1 mmol/L EDTA
- 10 mmol/L 磷酸缓冲液（pH8.0）
- 10 mg/ml Pluronic F127 表面活性剂（Sigma-Aldrich）
- 10 mmol/L 叠氮化钠<!>

  不同的蛋白质系统可能需要不同的钝化缓冲液。最好通过实验得到用于特定用途的最优的钝化缓冲液。

pBluescriptKS（250 ng/μl）

磷酸缓冲盐溶液（PBS）

引物 A（CTA AAT TGT AAG CGT TAA TAT TTT GTT AAA）（100 μmol/L）

引物 B（TAT CTT TAT AGT CCT GTC GGG TTT CGC CAC）（100 μmol/L）

pSB 110（100 ng/μl）

  这个载体有 *Xho*I、*Aat*II 和 *Eco*109I 的酶切位点（gift of S. Bigot）。

限制性内切核酸酶：*Xho*I、*Aat*II、*Eco*109I

Sigmacote（Sigma-Aldrich）<!>

T4 DNA 连接酶（Fermentas）

*Taq*（New England Biolabs）

10× *Taq* 无 $Mg^{2+}$ 缓冲液

双蒸水（$ddH_2O$）

## 设备

本实验方案描述的磁阱装置（显微镜、磁铁、平移台等）与一种用于商业化的版本（PicoTwist）相似

微珠，聚苯乙烯，非磁性，直径 2 μm（Polysciences）（可选；参照步骤 34）

这些微珠用作显微镜机械漂移运动的标志（见正文）。

微珠，磁性，链霉亲和素包覆，直径 1 μm；MyOne（Dynal）

连接器，聚丙烯（Fischer-Bioblock）

玻璃盖玻片（24 mm×60 mm；Menzel-Glaser）

电热板

磁铁（NdFeB 立方体，5 mm×5 mm×6 mm；VacuumSchmelze）

微量离心管

超滤柱（YM-100 column；Millipore）

倒置显微镜

聚酯薄膜（厚 50 μm）

PCR 热循环仪

培养皿

旋转器

注射器

双面胶带（Duplocoll 375；Lohmann-Durabloc）

双面胶带（厚 60 μm；Duplocoll 3205；Lohmann-Durabloc）

平移台马达（PI C-150. PD；Polytec）

机动化的平移台（PI M-126. PD；Polytec）

聚乙烯管（Tygon tubing）

# 方法

## 消化中心 DNA 片段

1. 混合以下成分：

| | |
|---|---|
| pSB110 | 10 μl |
| *Xho*I | 1 μl |
| *Aat*II | 1 μl |
| *Eco*109I | 1 μl |
| NEB4 | 3 μl |
| $ddH_2O$ | 36.5 μl |

2. 37℃孵育 1 h。

3. 65℃孵育 20 min。

## 标记 DNA 锚定片段

分别用毛地黄毒苷和生物素平行标记。

4. 混合以下成分：

| | |
|---|---|
| pBluescriptKS | 1 μl |
| Primer A | 1 μl |
| Primer B | 1 μl |
| dNTP | 1.5 μl |
| $Mg^{2+}$ | 2 μl |
| *Taq* 缓冲液 w/o $Mg^{2+}$ | 5 μl |
| *Taq* | 1 μl |
| 标记的 dUTP（毛地黄毒苷或生物素） | 1.5 μl |
| $ddH_2O$ | 36.5 μl |

5. 如下操作 PCR：

i. 94℃降解 5 min。

ii. 94℃ 30 s，54℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 30 次。

iii. 72℃孵育 5 min。

6. 用 YM-100 超滤柱纯化 PCR 产物。

## 消化毛地黄毒苷标记的片段

7. 混合下列成分：

| | |
|---|---|
| 毛地黄毒苷标记的片段（约 1 kb 浓度 50 ng/μl）（从步骤 6 中得到） | 10 μl |
| *Xho*I | 2 μl |
| NEB4 | 4 μl |
| $ddH_2O$ | 4 μl |

8. 37℃孵育 1 h。

9. 65℃孵育 20 min。

## 消化生物素标记的片段

10. 混合下列成分：

| | |
|---|---|
| 生物素标记的片段（约 1 kb 浓度 50 ng/μl）（从步骤 6 中得到） | 10 μl |
| *Aat*II | 2 μl |
| NEB4 | 4 μl |
| $ddH_2O$ | 4 μl |

11. 37℃孵育 1 h。

12. 65℃孵育 20 min。

## 连接锚定片段到中心 DNA 片段

13. 混合下列成分：

| | |
|---|---|
| 消化后的中心片段（约 30 ng/μl）（从步骤 3 中得到） | 2 μl |
| 消化后的毛地黄毒苷标记片段（约 20 ng/μl）（从步骤 9 中得到） | 15 μl |
| 消化后的生物素标记片段（约 20 ng/μl）（从步骤 3 中得到） | 15 μl |
| 10×连接酶缓冲液 | 10 μl |
| T4 连接酶 | 4 μl |
| $ddH_2O$ | 52 μl |

14. 16℃孵育 2 h。
15. 65℃孵育 20 min。

## 处理玻璃盖玻片

16. 用 5 mol/L NaOH 冲洗盖玻片。放置约 1 min。
17. 用 $ddH_2O$ 冲洗。
18. 在电热板上 125℃孵育 5 min。
19. 加入 Sigmacote 并且孵育 1～2 min。
20. 吹干。
21. 在电热板上 125℃孵育 30 min。
22. 用 $ddH_2O$ 冲洗。

## 构建微操作室

最终形成的通道的维度是 50 mm×5 mm×60 μm，体积为 15 μl。更多细节请参照图 16-1B 和正文。

23. 在 60 μm 厚的双面磁带上切出通道（50 mm×5 mm）。
24. 在 50 μm 厚的聚酯薄膜上打两个洞。
25. 将双面胶带夹在盖玻片和聚酯薄膜中间。
26. 用双面胶带（Duplocoll375）将两个聚丙烯连接器连接到聚酯薄膜上。
27. 将两个泰贡塑管连接到连接器上。
28. 将一个泰贡塑管连接到注射器上。

    这是用来从空腔中吸出液体的。
29. 将一个泰贡塑管连接到储液池上。

    这是用来向空腔中注射溶液的。
30. 在两个固定在平移台上的圆筒间拉展聚酯薄膜。

    这个可以用（*x*，*y*）坐标定位。

## 抗体处理和微操作室的钝化

31. 在微操作室中加入 50 μl 毛地黄毒苷抗体。
32. 在潮湿的容器（如垫有湿润纸张的培养皿）中 37℃孵育过夜。

33. 若在表面结合非磁性微珠，接下来到步骤 34。否则就从步骤 40 继续实验。

## 非磁性微珠的固定

根据使用的抗体/钝化的组合不同，可能需要另一个在表面结合非磁性微珠的实验过程。在某些情况下，磁性微珠和表面的非特异性结合也许足以提供所需要的固定微珠的量。

34. 用 $ddH_2O$ 冲洗腔内。
35. 向与腔体连接的储液池中注入 10 μl 未稀释的聚苯乙烯微珠溶液。
36. 用注射器将微珠溶液吸入微操作室中。

    通过加入适当的缓冲液来保持储液池处于充满的状态。
37. 当微珠沿腔的长边分布均匀的时候，停止液体的流动。
38. 让聚苯乙烯微珠沉淀。孵育约 1 min。

    确切的孵育时间可能因微操作室的不同而不同。
39. 当需要量的微珠结合到表面时，用注射器吸出多余缓冲液。
40. 用钝化缓冲液冲洗。

    这也用来冲洗掉未结合的非磁性微珠。
41. 用钝化溶液在潮湿的容器中孵育 2～4 min。

    微操作室在不使用时可以 4℃储存。

## 在磁性微珠上锚定 DNA

42. 在 200 μl 钝化缓冲液中洗 10 μl 磁性微珠（10 mg/ml）。
43. 在 10 μl 钝化缓冲液中重悬微珠。
44. 微离心管底部滴加 1 μl DNA 产物。
45. 将上述 10 μl 微珠滴加在 DNA 液滴上，轻弹混匀。
46. 在旋转器上放置 5 min，防止微珠沉淀。
47. 在 DNA-微珠溶液中缓缓加入 40 μl 钝化缓冲液减弱反应。
48. 上下颠倒管子（避免液体漏出）或者在拇指和食指间旋转管子将微珠重悬均匀。

## 将 DNA-微珠混合物锚定在微操作室内

49. 将磁性物质远离流动池，越远越好（约 25 mm）。
50. 将 5 μl 微珠-DNA 混合物（从步骤 48 中得来）注入连接在腔上的储液池中。
51. 用注射器将微珠-DNA 溶液吸入微操作室中。

    通过加入适当的缓冲液来保持储液池处于充满的状态。
52. 当微珠沿腔的长边分布均匀的时候，停止液体的流动。
53. 使磁性微珠沉淀。孵育 5 min。
54. 用适当的缓冲液冲洗（参见排疑解难）。

    这样，样品已经能够用反式显微镜/磁镊结合起来进行观察和实验操作了。

## 排疑解难

**问题**：DNA-磁性微珠复合体与微操作室表面非特异性反应。

［**步骤 54**］

**解决方法**：在将 DNA 包覆的微珠锚定到微操作室中时向需要的缓冲液中加入少量（如约 0.1% *m*/*V*）的 BSA 和 Pluronic F127。

## 致谢

感谢 K. C. Neumann、G. Lia、G. Charvin、E. Praly 和 A. Meglio 与我们进行的有益的讨论。感谢 G. Charvin 在图像设计上的帮助，S. Bigot 和 F. -X. Barre 在 DNA 底物准备中的帮助。这项工作得到了 Centre National de la Recherche Scientifique，Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques，Ecole Normale Superieure 和 Universities Paris VII 和 VI 的支持，同时得到了 Association pour la Recherche contre le Cancer，Agence Nationale de la Recherche 和 Europen Union（Biosense）的许可。

### 参考文献

Ali B.M., Amit R., Braslavsky I., Oppenheim A.B., Gileadi O., and Stavans J. 2001. Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10658–10663.

Allemand J.-F., Bensimon D., Lavery R., and Croquette V. 1998. Stretched and overwound DNA form a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 14152–14157.

Allemand J.-F., Bensimon D., Jullien L., Bensimon A., and Croquette V. 1997. pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys. J.* **73:** 2064–2070.

Amit R., Gileadi O., and Stavans J. 2004. Direct observation of RuvAB-catalyzed branch migration of single Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 11605–11610.

Avery O.T., MacLeod C.M., and McCarthy M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* **79:** 137–158.

Berg-Sorensen K. and Flyvbjerg H. 2004. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 594–612.

Bouchiat C., Wang M., Block S.M., Allemand J.-F., Strick T., and Croquette V. 1999. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys. J.* **76:** 409–413.

Bracewell R. 1999. *The Fourier transform and its applications,* 3rd ed. McGraw-Hill, New York.

Bryant Z., Stone M.D., Gore J., Smith S.B., Cozzarelli N.R., and Bustamante C. 2003. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature* **424:** 338–341.

Bustamante C., Marko J., Siggia E., and Smith S. 1994. Entropic elasticity of λ-phage DNA. *Science* **265:** 1599–1600.

Charvin G., Strick T.R., Bensimon D., and Croquette V. 2005a. Topoisomerase IV bends and overtwists DNA upon binding. *Biophys. J.* **89:** 384–392.

Charvin G., Vologodskii A., Bensimon D., and Croquette V. 2005b. Braiding DNA: Experiments, simulations, and models. *Biophys. J.* **88:** 4124–4136.

Charvin G., Allemand J.-F., Strick T.R., Bensimon D., and Croquette V. 2004. Twisting DNA: Single molecule studies. *Contemp. Phys.* **45:** 383–403.

Chee M., Yang R., Hubbell E., Berno A., Huang X., Stern D., Winkler J., Lockhart D.J., Morris M.S., and Fodor S.P.A. 1996. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274:** 610–614.

Danilowicz C., Coljee V.W., Bouzigues C., Lubensky D.K., Nelson D.R., and Prentiss M. 2003. DNA unzipped under a constant force exhibits multiple metastable intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1694–1699.

Dawid A., Croquette V., Grigoriev M., and Heslot F. 2004. Single-molecule study of RuvAB-mediated Holliday-junction migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 11611–11616.

Dessinges M.-N., Lionnet T., Xi X., Bensimon D., and Croquette V. 2004. Single molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 6439–6444.

Einstein A. 1956. *Investigation of the Brownian theory of movement.* Dover Publications, New York.

Friese M.E., Enger J., Rubinsztein-Dunlop H., and Heckenberg N.R. 1996. Optical angular-momentum transfer to trapped absorbing particles. *Phys. Rev. A* **54:** 1593–1596.

Friese M.E.J., Nieminen T.A., Heckenberg N.R., and Rubinsztein-Dunlop H. 1998. Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles. *Nature* **394:** 348–350.

Fulconis R., Bancaud A., Allemand J.F., Croquette V., Dutreix M., and Viovy J.L. 2004. Twisting and untwisting a single DNA molecule covered by RecA protein. *Biophys. J.* **87:** 2552–2563.

Gore J., Bryant Z., Stone M.D., Nollmann M., Cozzarelli N.R., and Bustamante C. 2006. Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking. *Nature* **439:** 100–104.

Gosse C. and Croquette V. 2002. Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.* **82:** 3314–3329.

Hershey A. and Chase M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **1:** 39–56.

Koster D.A., Croquette V., Dekker C., Shuman S., and Dekker N.H. 2005. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase Ib. *Nature* **434:** 671–674.

La Porta A. and Wang M.D. 2004. Optical torque wrench: Angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Phys. Rev. Lett.* **92:** 190801.

Lee G.U., Chrisey L.A., and Colton R.J. 1994. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **266:** 771–773.

Leger J.F., Romano G., Sarkar A., Robert J., Bourdieu L., Chatenay D., and Marko J.F. 1999. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.* **83:** 1066–1069.

Leuba S.H., Karymov M.A., Tomschik M., Ramjit R., Smith P., and Zlatanova J. 2003. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: Magnetic tweezers study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 495–500.

Lia G., Bensimon D., Croquette V., Allemand J.F., Dunlap D., Lewis D.E., Adhya S., and Finzi L. 2003. Supercoiling and denaturation in Gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 11373–11377.

Lia G., Praly E., Ferreira H., Stockdale C., Tse-Dinh Y.C., Dunlap D., Croquette V., Bensimon D., and Owen-Hughes T. 2006. Direct observation of DNA distortion by the RSC complex. *Mol. Cell* **21:** 417–425.

Lionnet T., Joubaud S., Lavery R., Bensimon D., and Croquette V. 2006. Wringing out DNA. *Phys. Rev. Lett.* **96:** 178102.

Maier B., Bensimon D., and Croquette V. 2000. Replication by a single DNA-polymerase of a stretched single stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 12002–12007.

Marko J. and Siggia E. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules* **28:** 8759–8770.

Nieminen T.A., Heckenberg N.R., and Rubinsztein-Dunlop H. 2001. Optical measurement of microscopic torques. *J. Mod. Optics* **48:** 405–413.

Ovryn B. 2000. Three-dimensional forward scattering particle image velocimetry applied to a microscopic field-of-view. *Exp. Fluids* **29:** S175–S184.

Ovryn B. and Izen S.H. 2000. Imaging of transparent spheres through a planar interface using a high-numerical-aperture optical microscope. *J. Opt. Soc. Am. A* **17:** 1202–1213.

Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., and Flannery P.B. 1992. *Numerical recipes in C: The art of scientific computing,* 2nd ed. Cambridge University Press, London.

Reif F. 1965. *Fundamentals of statistical and thermal physics.* McGraw-Hill, New York.

Revyakin A., Ebright R.H., and Strick T.R. 2005. Single-molecule DNA nanomanipulation: Improved resolution through use of shorter DNA fragments. *Nat. Methods* **2:** 127–138.

Revyakin A., Liu C., Ebright R.H., and Strick T.R. 2006. Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science* **314:** 1139–1143.

Revyakin A., Allemand J.F., Croquette V., Ebright R.H., and Strick T.R. 2003. Single-molecule DNA nanomanipulation: Detection of promoter-unwinding events by RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **370:** 577–598.

Saleh O.A., Bigot S., Barre F.X., and Allemand J.F. 2005. Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12:** 436–440.

Saleh O.A., Perals C., Barre F.X., and Allemand J.F. 2004. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.* **23:** 2430–2439.

Sano T., Smith C.L., and Cantor C.R. 1992. Immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* **258:** 120–122.

Seidel R., van Noort J., van der Scheer C., Bloom J.G., Dekker N.H., Dutta C.F., Blundell A., Robinson T., Firman K., and Dekker C. 2004. Real-time observation of DNA translocation by the type I restriction modification enzyme EcoR124I. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 838–843.

Shivashankar G.V., Feingold M., Krichevsky O., and Libchaber A. 1999. RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7916–7921.

Smith D.E., Tans S.J., Smith S.B., Grimes S., Anderson D.L., and Bustamante C. 2001. The bacteriophage straight ϕ29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* **413:** 748–752.

Smith S., Finzi L., and Bustamante C. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* **258:** 1122–1126.

Strick T., Bensimon D., and Croquette V. 1999. Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA. *Genetica* **106:** 57–62.

Strick T., Croquette V., and Bensimon D. 2000. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* **404:** 901–904.

Strick T., Allemand J.-F., Bensimon D., and Croquette V. 1998. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.* **74:** 2016–2028.

Strick T., Allemand J., Bensimon D., Bensimon A., and Croquette V. 1996. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271:** 1835–1837.

Watson J. and Crick F. 1953a. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171:** 964–967.

———. 1953b. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171:** 737–738.

Yan J., Skoko D., and Marko J.F. 2004. Near-field-magnetic-tweezer manipulation of single DNA molecules. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **70:** 011905.

Yang M.S., Yau H.C.M., and Chan H.L. 1998. Adsorption kinetics and ligand-binding properties of thiol-modified double-stranded DNA on a gold surface. *Langmuir* **14:** 6121–6129.

## 网络资源

**www. picotwist. com** PicoTwist 公司生产“plug-and-play”磁阱系统。

（唐　兢　译）

# 第 17 章　利用原子力显微镜进行多糖和蛋白质的力学探测

**Mahir Rabbi　Piotr E. Marszalek**

Center for Biologically Inspired Materials and Material Systems and
Department of Mechanical Engineering and Materials Science,
Duke University，Durham，North Carolina 27708

## 摘要

原子力显微镜（atomic force microscope，AFM）是一种探测单个多糖和蛋白质力学性质（如长度和张力）的极好的力谱仪。本章中，我们介绍如何搭建和操作一台 AFM 为基础的力谱仪来探测这些生物大分子。我们也逐步介绍用 AFM 力谱法测量单个多糖和蛋白质的步骤，并且讨论如何依据熵弹性的基本模型对结果进行分析和解释。

## 概述

生物体内的多糖和蛋白质经常容易受到机械力的影响。因为这些力会影响大范围的生物活动（表 17-1），所以开发能够用于直接研究这些分子机械性质的方法是非常重要的。最近的技术进展能够在单分子水平上进行生物高聚物的力学操作，揭示了蛋白质和多糖的复杂的弹性性质（Fisher et al. 2000）。

**表 17-1　体内多糖和蛋白质力学的例子**

| 分子 | 力来源 | 参考文献 |
|---|---|---|
| 钙黏着蛋白 | 细胞-细胞黏附作用 | Baumgarter et al.（2000） |
| 肝素-抗凝血酶 III 复合物 | 分子间力 | Guerrini et al.（2006） |
| 细胞壁多糖 | 溶菌酶反应 | Kirby（2001）；Vocadlo et al.（2001） |
| 细胞壁多糖 | 肿胀压力 | Marszalek et al.（1998） |
| 螺旋三级结构的蛋白质 | 机械转换 | Howard and Bechstedt（2004）；Sotomayor et al.（2005）；Lee et al.（2006） |
| 血影蛋白 | 红血细胞变形 | Rief et al.（1999）；Law et al.（2003） |
| 肌腱蛋白，纤维结合蛋白 | 细胞外矩阵张力 | Oberhauser et al.（1998，2002） |
| 肌联蛋白 | 肌肉拉伸时的肌小节伸展 | Rief et al.（1997b）；Marszalek et al.（1999b）；Li et al.（2002）；Williams et al.（2003） |

原子力显微镜（Binning et al. 1986；Rugar and Hansma 1990）是一种探测单分子力学性质（如长度和张力）的极好的力谱仪，它能够在亚纳米和皮牛顿的分辨率下分别测量单分子的长度和张力。与其他的力谱测量工具如光钳（见第 13 章、第 14 章和第 15 章）或磁钳（见第 16 章）等相比，AFM 能对生物分子施加更大的拉力。这些拉力将生物分子的成分转变到更高级并能探测的构象，这是其他的力谱测量技术所不能及

的，并且也无法用大多数传统的光谱法如核磁共振（NMR）等进行研究（Fisher et al. 2000）。因此，基于 AFM 技术的单分子力谱（single-molecule force spectroscopy，SMFS）不仅能检测多糖和蛋白质接近平衡构象的机械性质，而且还能独特地探查它们更不确定的状态。这样，它可以检测平衡结构以及提供机械力的内部力，也可以检测多糖的构象转变（Zhang et al. 2005a）以及蛋白质的展开和重折叠的方式（Dietz and Rief 2004；Fernandez and Li 2004，Lee et al. 2006）。

本章对多糖和蛋白质的力学性质做了一个简略的综述，并根据熵弹性的基本模型讨论了这些性质。然后介绍了如何搭建和操作一台单分子力谱仪来探测这些生物大分子的力学性质（实验方案 1）。接下来分节单独介绍多糖（实验方案 2）和蛋白质（实验方案 3）的力谱测量方法。每节包含了一个实际操作问题的讨论，提供一个详细的 AFM 力谱测量单个多糖和蛋白质的操作步骤以及实验数据的各种分析、解释和排错的方法。

## 多糖和蛋白质力学的概述

### 熵弹性

给予单个聚合体分子一个外部拉力，每个单体成分都会沿着拉力的方向呈线性排列。这就引起了聚合体构型熵的下降，使分子产生了趋向于恢复聚合体不规则构象的一个张力。因为这个张力，聚合体被称为“熵弹簧”。

一个线性聚合物的弹性行为可以用一个将聚合物的主链当作取向独立、不能伸展的库恩片段的自由连接链（FJC）模型来描述（图 17-1 A）（Flory 1953）。一个可替代的模型假定聚合物由弹性物质组成的杆聚集而成，并且它的刚性以聚合物原始取向长度，即持续长度（类蠕虫链模型，WLC）来表征（图 17-1 B）（Flory 1989；Bustamante et al. 1994）。这些模型可以通过考虑单体成分的内在热焓弹性（$k_{segment}$）进一步地扩展（Smith et al. 1996）。

### 多糖的力学

与其他聚合物相似，多糖的行为与熵弹簧一样，尽管它们的张力要相对低。用 AFM 进行伸展测量说明在较高作用力下，大多数多糖的弹性偏离了聚合物弹性的熵模型（Marszalek et al. 2001）。例如，在图 17-2 中介绍的 5 个多糖中，只有甲基纤维素（图 17-2 E）与扩展的 FJC 模型一致，而其他 4 个多糖都偏离了这个模型。这些偏离可以从力-伸展曲线的平台特性表现出来，能反应各种由力诱导的糖环的构象转变。例如，椅形-船形的转变（Marszalek et al. 1998，1999a）或环外基团的受迫转动（Rief et al. 1997a；Lee et al. 2004b）。这些受迫转变增加了糖苷链氧原子的分离，因此增加了伸展力作用下的多糖链的轮廓长度（Marszalek et al. 1999a）。AFM 触发和捕获这些受迫的构象转变的能力是多糖 SMFS 的基础（见综述，Zhang et al. 2005a）。

### 模块蛋白（modular protein）的力学

蛋白质力学方面许多很好的研究已经使用各种蛋白质、肌联蛋白和基于肌联蛋白的重组蛋白作为基于 AFM 的 SMFS 的模型体系（Rief et al. 1997b；Marszalek et

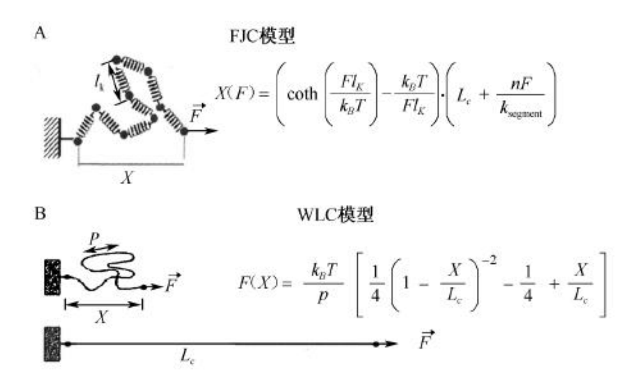



图 17-1 聚合体弹性的自由连接链（FJC）模型（A）和类蠕虫链（WLC）模型（B）。A. 一个 FJC 由 $n$ 个单体组成，每个单体有固定的长度并且是线性连续的连接。键结合点的角度可能会呈现出所有值，并且有相等的出现概率，而键可自由旋转。一个实际的聚合物链可以通过一个由取向独立的长度 $l_k$ 的假定库恩片段组成的相等的 FJC 来估计［每个库恩片段（最短的可能片段被认为是独立的）由一系列的单聚体组成］。为了用一个间距 $X$ 来分离聚合物的末端，我们实施一个外力（$F$）来减少聚合物的熵（增加它的自由能）。由这些库恩片段组成的 FJC 的 $X$ 和 $F$ 之间的关系可以用 Langevin 函数（左边括弧里的术语）和轮廓长度 $L_c$，加上 $n$ 键伸展产生的额外的张力的乘积来描述，每个键用弹簧常数 $k_{segment}$（片段弹性）表示。B. 类蠕虫链用表现链的每个片段的定向相关性性质的持续长度 $P$ 和轮廓长度 $L_c$ 来描述。$k_B$ 是玻耳兹曼常数，$T$ 是绝对温度。

*al*. 1999b；Li et al. 2002；Williams et al. 2003）。肌联蛋白对维持肌肉弹性是很重要的，具有很强的力学特性（表 17-1）。它由独立折叠域组成，这些折叠域通过柔性连接区相连，就像“弹簧上的珠子”一样。

图 17-3 显示了用 AFM 在单个工程蛋白上得到的力-伸展关系的几个实例，这个工程蛋白是由来自人心肌肌联蛋白的串联重复的 I27 模块组成的（图 17-3 A）（Marszalek et al. 1999b）。因为它的“弹簧上的珠子”的结构，在较小的力作用下（$F<100$ pN）肌联蛋白的弹性遵循了 WLC 模型（图 17-3 B、C，细实线）。然而在较大的力（$F>100$ pN）作用下，这些模块被一个一个拆开，呈现出均匀间隔的力峰的独特锯齿模式（图 17-3 B、C，粗实线）。每个力峰代表了多聚蛋白的一个单一肌联蛋白域的机械展开，而它们之间的间隔是对应“隐藏”在折叠模块和释放的伸展模块中多肽链的长度（见综述，Fisher et al. 2000）。这样一个由减少的折叠模块和增加的伸展模块组成的多肽链的全部弹性可以大致用 WLC 模型中轮廓长度 $L_c$ 连续增加产生的一组 WLC 曲线来描述（图 17-1 B，图 17-3 B、C，细实线）。

很明显，模块蛋白并不是简单的 WLC，因为它们全部的熵弹性是被结构域的有序拆分所调节的。仔细观察图 17-3B 力谱（获自野生型 I27 多聚蛋白质）可以发现作用力大于 100 pN 时 WLC 力峰出现偏离，但该现象早于发生在约 200 pN 作用力下的主要去折叠事件（图 17-3 B，箭头）。这些驼峰样曲线捕获了野生型蛋白伸展过程中的去折叠

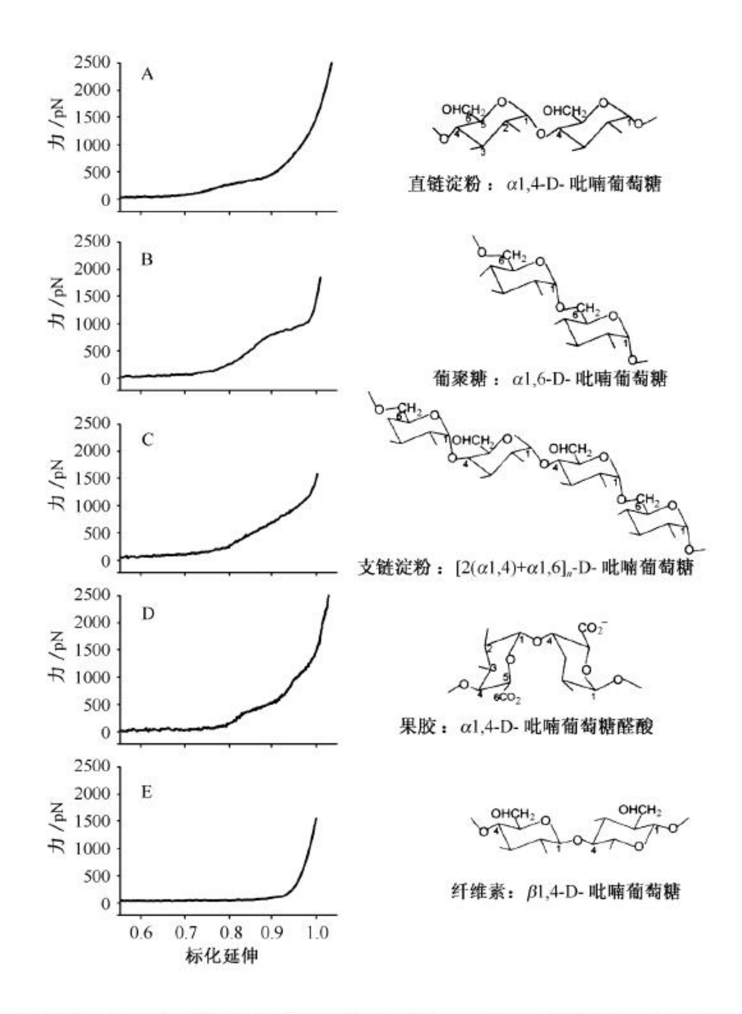



图 17-2 AFM 得到的线性多糖的弹性指纹。（左图）通过在一个底面和AFM 悬臂之间垂直拉伸每个分子，而得到的溶液中单个多糖的力-伸展关系曲线。(右图）每个多糖的简化的单体和糖苷键的类型。左侧显示的是每个单体相应的力-伸展曲线。除了甲基纤维素（E）以外的所有力-伸展曲线显示了与纯粹熵弹性的偏离。这些偏离是单体和链接的特性化的“指纹”。所有扩展用一个 1500 pN 的力测定的分子长度进行标准化（改编自 Marszalek et al. 2001)。

中间体的力学特征。I27 蛋白的 KCP 突变是一个某些内部氢键已经消失的突变(Marszalek et al. 1999b)，对它来说没有检测到去折叠中间体，也没有观察到每个力峰上升相偏离（图 17-3 C)。AFM 检测单个多肽链熵弹性的能力与它捕捉蛋白质力学展开和重折叠的细节，包括各种中间状态的鉴定，一起构成了天然和工程模块蛋白力谱分析的基础。

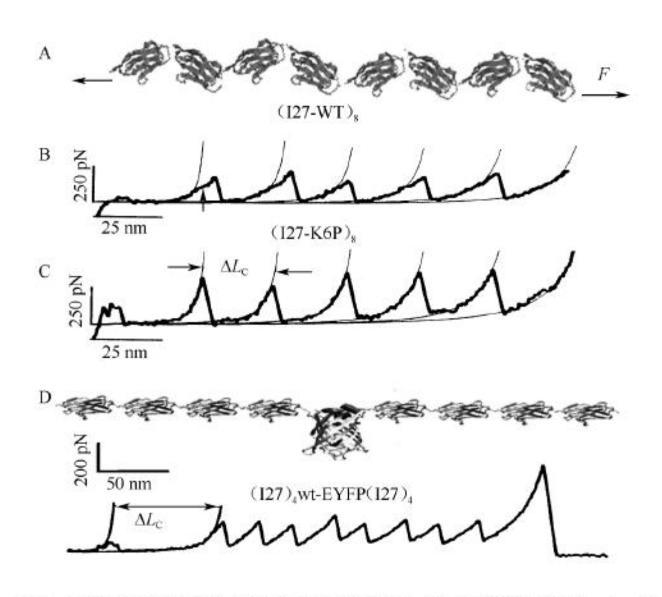



图 17-3 AFM 单分子力谱测定的工程模块蛋白的力-伸展关系的范例。A. 由 8 个串联重复野生型（WT）肌联蛋白域#27（I27）组成的工程蛋白示意图。B. 一个（I27）8 蛋白的力-伸展曲线的例子，曲线表现出均匀间隔的展开力峰的特征性锯齿模式（粗实线）。WLC 拟合到峰的上升相（细实线）。注意（I27）8 表示出展开峰上升相中明显的类驼峰特性，这个特性在第一个峰中最为显著，在后面的展开事件中慢慢减弱。因为这个类驼峰特性，（I27）8 蛋白的弹性量变曲线偏离了熵弹性的模型。这个偏离是由一个去折叠中间体引起的，能在模块完全拆开之前可逆地把每个模块伸展大约 7 Å，并产生弹性量变曲线中的驼峰。这些偏离能被 I27 模块的一个点突变——K6P 阻断。这个突变消除了模块氨基端的两个氢键，导致 I27 模块的 A、B 链（两个链都是单个 I27 多肽链的部分）发生轻微的分离，从而去除了去折叠中间体。因此，突变的多聚蛋白（I27-K6P）8 的熵弹性很接近 WLC 模型的熵弹性（C）。D.（上面的轨迹）每个侧面连接 4 个 I27 域的 EYFP 蛋白构建的多聚蛋白示意图。这些 I27 柄作为单分子指纹起作用。D.（下面的轨迹）（I27）4 wt-EYFP（I27）4 的力-伸展曲线，显示一个 I27 柄有序展开前（具有 8 个展开峰的相等间隔的锯齿模式）$\Delta L_c = 79$ nm 分离的小 EYFP 展开峰。5 个或更多 I27 展开峰的锯齿模式保证了 EYFP 分子是展开的（Perez-Jimenez et al. 2006）。注意展开顺序不是按照多聚蛋白的模块位置，而是遵循模块力强度的层级。所以，EYFP 蛋白的机械力要弱于 I27 域。（D，改编自 Perez-Jimenez et al. 2006）

## 单功能域蛋白质的力学

AFM 中伸展模块蛋白产生的高度规则的锯齿模式允许单个蛋白质的测量和一个未知伸展系列的测量进行可靠的比较，这个未知的伸展蛋白产生了复杂的缺乏任何规则的力-伸展模式（如比较图 17-6A 和图 17-8A，我们将在后面详细讨论）。小的、单域蛋白的力学性质一般不会产生强的指纹，因此为了研究这些性质，将这种蛋白质的氨基和羧基端两侧都连接上一些模块蛋白（如若干个 I27 域组成）是很有研究优势的（图 17-3D）。这些域伸展时会产生特殊的锯齿模式，这是个单蛋白记录的特有指纹。这

种方法允许研究一个小蛋白质的未知的力学性质，假设它的力学性质（如隐藏在三级结构中的多肽链的稳定性和长度）与被用作力学指纹的模块蛋白的力学性质不同（图 17-3D）（Dietz and Rief 2004；Perez-Jimenez et al. 2006）。利用这种方法，研究者能够检测增强的黄荧光蛋白 EYFP 的力学展开方式（图 17-3D）（Perez-Jimenez et al. 2006），带有 I27 嵌合结构的芽孢杆菌 RNA 酶的受迫展开（Best et al. 2001），以及绿荧光蛋白 GFP 力学变性的能级情况（Dietz and Rief 2004）等。

## 仪器设备

SMFS 依赖分子长度和张力的精确测量。大体上，任何 AFM 仪器能够被当作一个力谱仪使用，但是移动样本或悬臂来拉伸分子（图 17-4）的压电式激励器必须配备一个能够在伸展-释放循环中精确报告位置的传感器。对于这个要求的原因是压电式激励器能显示明显的磁滞现象、受到压力作用后出现蠕变，以及热漂移。如果激励器的位置并不是直接测量的话，那么所有这些效应在测量一个分子长度时会产生很大的不确定性。因此，要在纳米级精度确定分子伸展，需要在实验中测量压电式激励器的位置。

以前的 AFM 首先是设计用于成像并没有配备直接测量压电式激励器位置的传感器。而目前的商业化的 AFM 的设计同时适用于成像和力谱测量，如 Picoforce（Veeco）或 MFP-3D BIO（Asylum Research），所以配备了能够充分测量控制分子扩展的压电式激励器的位置的位置传感器。

对于多糖（实验方案 2）和蛋白质力学（实验方案 3）的测量，我们假设研究者有机会使用能够测量力-伸展曲线的商业化 AFM 仪器。然而，对于那些无法使用商业化仪器的研究者，实验方案 1 中描述的过程能够用于搭建一个便宜的单分子钳。具有力学工程、基础电子知识、数据采集技术以及一些电脑程序（如具有 LabView、Matlab 或 Igor）背景知识的人应该能够搭建这种仪器。

## 实验方案 1：单轴分子钳的搭建

以下的步骤介绍了一台 AFM 的基础设计和搭建：一个单轴分子钳（图 17-4A）。AFM 有 4 个部分：头部、基底、电子器件和软件。在搭建一个组合的仪器之前最好先研究商业化的 AFM。

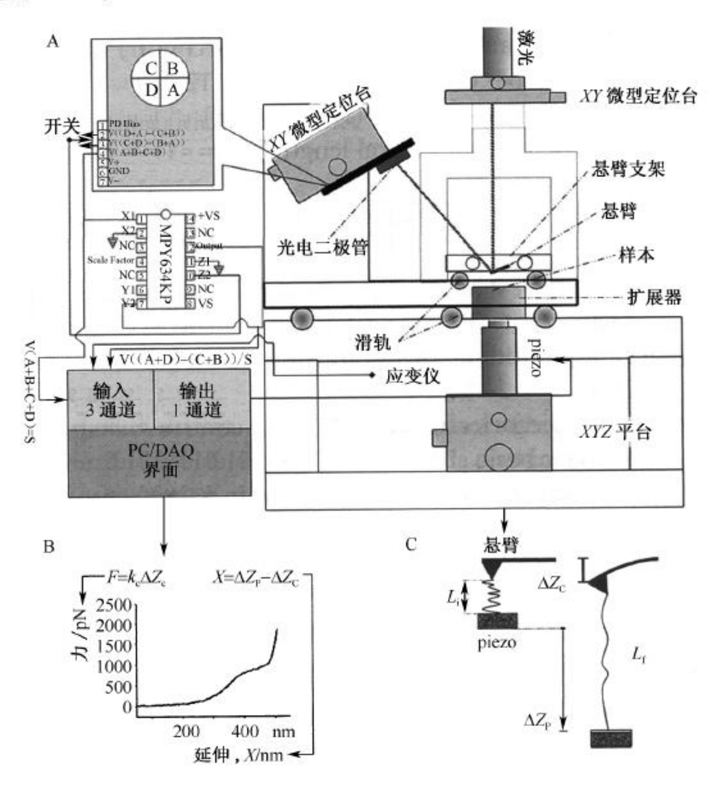



图 17-4 A. 自制单轴力谱仪的示意图。AFM 探测器头部安装了一个放置在 *XY* 微型定位台上的位置敏感的光电二极管，以及一个能够聚焦到 AFM 悬臂上的激光器。头部装配到一个单轴压电电动机的顶端，用于移动样本改变它们相对于 AFM 悬臂的位置。压电激励器必须装配一个能精确测量压电移动的位置传感器。一个由电脑程序控制的带 PC 的数据采集板被用于控制压电定位器（$Z_P$）。放大器对于驱动压电激励器、应变仪控制模块以及低通滤波器是必需的，这里没有显示（见文本）。B. 一个用 AFM 力谱测量仪获得的力-伸展曲线（力谱）的例子。多糖右旋糖苷的力-伸展曲线。C. 用 AFM 伸展一个多糖链（左图，未伸展；右图，伸展）。一个链的伸展，从它起始末端-末端的长度 *L* 到最终长度 $L_f$，需要一个力，这个力能被监控，表现为悬臂的偏转——$\Delta Z_C$。这个力可以用光电二极管测量，表现为电压 V［(A+D) − (B+C)］/V (A+B+C+D) 的变化，这个变化是由入射激光束的移动产生的。然后这个力用公式 $F=k_C\Delta Z_C$ 来计算。分子伸展是 $X=L_f-L_i$，能从 piezo 的移动，$\Delta Z_P$，计算得到 $X=\Delta Z_P-\Delta Z_C$。AFM 悬臂的弹簧常数 $k_C$ 必须在每次实验前进行校准。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 设备

AFM 悬臂（如来自 Veeco、Asylum Research 或 Olympus，Inc.）

通过弹簧绳索悬挂于天花板下的气垫桌或平台

模拟除法器（Texas Instruments，MPY634KP）

数据采集（DAQ）界面

　　这是一个 M 系列多功能 DAQ，具有 16 bit 的 32 个模拟输入和 4 个模拟输出，装备有 68 pin 阳连接器的直角 PWB 以及 PC 上的 NI-DAQ 软件（National Instruments，NI PCI-6259）。

可聚焦的激光和光学仪（Schafter＋Kirchhoff）[1]＜!＞

　可聚焦光纤校准仪（60FC-4-M12-10）

　激光二极管电子束源（58FCM-SM）

　微聚焦光学仪（聚焦长度［$f'$］＝60.2 mm；数字孔径［NA］＝0.125）（5M-M60-13）

　电源（100～240 V AC；5 V DC）（PS051004）

悬臂固定器的材料

　　固定器在视觉上必须非常光亮，这样激光可以穿透悬臂。聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）＜!＞是一种极好的选择材料，因为它非常光亮且容易加工。

内置合成和差分线路的象限光电二极管（Pacific Silicon Sensor，QP50-6SD2）

带有控制系统的单轴压电式激励器（Physik Instruments）

　控制器基础底盘（9.5"）（E-501.00）

　带有整合应变仪传感器的线性激励器（P-841.10）

　LVPZT 放大器组件（－20～120 V，3 通道）（E-503.00）

　带有应变仪的 PZT 传感器/控制器组件（E-509.S1）

激光定位平台（Newport，MS-500-XY）、光电二极管定位平台（Newport，DS40-XY）和压电定位平台（Newport，DS40-XYZ）

铝托盘

　　铝是一种很好的选择材料，因为它不生锈并且容易加工。

滤除噪声的可调的活动滤波器（低通的、8 电极 Bessel 滤波器；频率设备，Inc.，950LSL）

---

[1] 现在 Schäfrer & Kircholf 提供了一种新型激光二极管电子来源，51 nanoFCM，该电子束源与光学器件匹配，降低了电源噪声和相干距离，从而降低了对光电二极管的光干扰（见实验方案 2，排疑解难）。

## 方法

### 头部

1. 搭建铝机架。将所有部件安全地放置在机架内，保证 AFM 的每个单独成分之间的相对位置都被正确地放置。

   有些位置是非常关键的，如悬臂的位置应在激光的焦距上。机架底部有一个很大的空洞，样本将通过这个位置伸展。

2. 将激光放置在 *XY* 平台上，从而使悬臂的位置接近一个焦距的距离。

   将激光放置在一个二轴（*XY*）平台上，使它能够直接照亮悬臂的背部。微聚焦光学仪配备了一个可移动的镜头，能使激光精确地聚焦在悬臂的背部。

3. 搭建悬臂固定器。在固定器上制造一个凹槽安置悬臂的芯片；悬臂的芯片应该要适合凹槽，在固定器表面下方倾斜约 15°。用一个小夹子和弹簧小心地固定芯片。

   悬臂固定器应该紧紧地固定悬臂芯片，只能允许悬臂简单地变化。倾斜度使悬臂尖端位置在装配夹的下面，使得悬臂尖端而不是悬臂的装配夹与底层接触。例如，在水溶液中，固定器必须利于溶液的添加和去除，尽可能通过穿过固定器的钻孔的小毛细管来进行。

4. 使用以下其中一个方法来放置悬臂固定器，使悬臂直接位于激光下面，接近它的焦距。保证固定器绝对水平。

   i. 在固定器滑片里制造一个凹槽，然后用螺丝将它固定。

   ii. 在固定器底部钻两个小的缺口，在头部也钻两个小缺口，直接位于底部缺口的下方。将固定器放置在孔中的两个小球上（图 17-4A），第三个孔和小球使它水平。用固定螺丝将固定器压在小球上以防移动。

5. 将光电二极管安装在 *XY* 平台上，保证激光束尽可能地正常入射。

   将光电二极管放置在一个两轴的 *XY* 平台上，确定它的位置，使激光束在悬臂上的反射能照亮它的中心。悬臂和光电二极管的距离必须最小。

### 基座

6. 搭建基础结构。

   基底固定 *XYZ* 平台，而 piezo 放置在该平台上，所以基底的高度必须适应 piezo 和 *XYZ* 平台的高度。基底顶部必须有一个孔，样本可以通过这个孔突出。

7. 用螺丝钉或夹子将 piezo 紧紧固定在 *XYZ* 平台上的相应位置上。

   *XYZ* 平台考虑到了样本相对于悬臂的粗略的垂直移动和样本水平的重定位。一个固定的平台是理想的，它能够防止 piezo 和平台运动的耦合。

8. 将一块小的磁铁嵌入到伸展器中来固定样本。将伸展器旋紧到 piezo 的顶部。

   这将产生一个大的平台用以放置样本。为了避免头部安装好之后样本撞上悬臂，伸展器不能太高。

9. 在头部的末端钻三个孔，在基底的顶部也钻三个孔，使它们对应。把球放在孔中，然后将头部与基底拴在一起。

为了使振动减少到最小，必须将头部非常牢固地安装在基底上。头部-基底的界面必须反射三个球的悬臂固定器定位系统的界面（见步骤 4 ii）。如果头部是不对称的，那就需要更多的水准球来帮助平衡。

10. 将 AFM 放置在通过弹簧绳索挂在天花板下的气垫桌或平台上以消除振动。

为了采集尽可能小噪声的记录，消除整个显微镜的振动是至关重要的。AFM 设备必须具有大重量和低硬度的性质，这样才能尽可能地降低共振频率。

## 电子器件

11. 用电线将模拟除法器接到光电二极管上。

一个除法器可以通过总和信号除以差分信号来归一化光电二极管差分信号。这个归一化可以允许持续的光电二极管的记录，即使激光强度并不恒定。

12. 将光电二极管和压电连接到 PC/DAQ 界面。

i. 将光电二极管的两个输出：V(A+B+C+D) 和 V[(A+D)−(B+C)]/V(A+B+C+D)，以及 PZT 传感器/控制器的应变仪的输出连接到安装 PC 的 DAQ 界面的三个模拟输出通道上。

V[(A+D)−(B+C)]/V(A+B+C+D) 输出能够反映作用到悬臂上的力。用低通的、8 电极 Bessel 滤波器将它连接到 DAQ 界面。典型的安装用于力测量的滤波器是 500～1000 Hz。如果需要悬臂的功率谱时用 50 kHz 的频率。

ii. 将 LVPZT 放大器组件上的压电控制电压连接到一个模拟输出通道。

## 软件

13. 研发数据采集和分析软件，用于执行图 17-5 中所示的程序。

软件能用于操纵 AFM 并助于数据存储和分析。

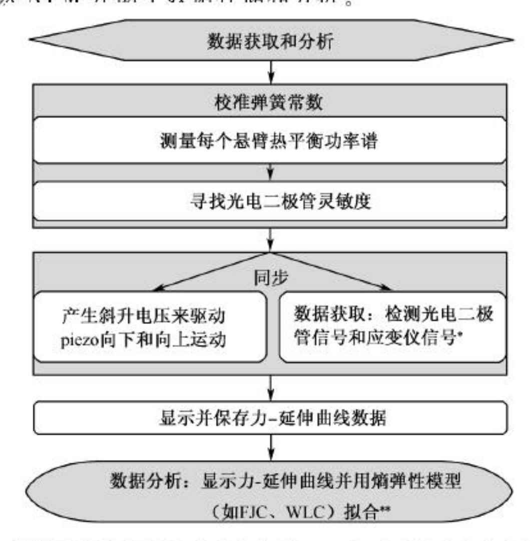



图 17-5　AFM 软件能够执行的程序的流程图。* 为了滤掉噪声使曲线平滑，用多项函数将应变仪信号进行拟合。** 延伸定义为（$\Delta_{压电}-\Delta_{悬臂}$）或 $X=\Delta Z_p-\Delta Z_c$。

## AFM 悬臂的选择

AFM 悬臂的两个特性参数对于力谱测定是非常重要的：弹簧常数 $k_C$（pN/nm）和共振频率 $f_0$（Hz）。Bustamante 等（2000）对影响 AFM 悬臂信噪比的因素进行了讨论。最敏感和最低噪声的悬臂（在低频带宽中，0～1000 Hz）具有小的弹簧常数（$k_C$ <10 pN/nm）和最高的可能共振频率。例如，Olympus 的超小 Biolever 悬臂，具有近似 3 pN 的力噪声均方根（1～500 Hz 带宽），能实现这些条件。这些悬臂非常昂贵并且易碎（即使浸入到溶液中也容易损坏），但是它们是测量最高为 500 pN 的力作用下蛋白质展开/重折叠的极好的工具。

对于多糖力谱来说，弹簧常数 10～20 pN/nm 的微控制杆（如 Asylum Research 或 Veeco）或者是来自 Veeco 的常规的弹簧常数为 100～160 pN/nm，力噪声均方根近似 12 pN 的（1～500 Hz 带宽）"宽且长"的氮化硅悬臂都是很好的选择。因为多糖中引起构象转变发生在相对高的力作用下，$F$>200 pN。在一些实验中，需要在尽可能最大力的作用下伸展多糖（$F\geqslant3$ nN）。所以，单-皮克牛顿范围的力分辨率不是必需的。

## AFM 悬臂的弹簧常数的校准

来源于同样一批晶片的 AFM 悬臂的弹簧常数值可能存在明显的差异（高达 ±50%），生产商提供的值只能作为定性的参考。因此每个悬臂在使用前必须进行校准。在校准 AFM 悬臂的几种方法中（见综述，Butt et al. 2005），一种被称为热方法的似乎在 SMFS 研究者中最流行（Florin et al. 1995）。这种方法以能量均分定理为基础，当能量均分定理应用到一个简单的谐波振荡器的悬臂系统模型中，悬臂的平均势能 $1/2\ k_C\ Z^2$ 等于"热能" $1/2\ k_B T$，式中，$k_C$ 为悬臂弹簧常数；$Z$ 为热平衡自由振荡的幅度；$k_B$ 为波尔兹曼常数；$T$ 为绝对温度。所以校准悬臂涉及 $Z^2$ 的确定。

实际上，$Z^2$ 不能直接测量到，只能从 $V^2$ 的测量确定，这里 $V$ 是分离光电二极管的电压，由沿着悬臂移动的激光束所产生。为了将 $V^2$ 转变为 $Z^2$，必须确定光电二极管电压 $V$ 的敏感性 $S$，悬臂弯曲度总计 $Z$，用公式 $S=V/Z$ 换算。测定 $S$ 时，需要把悬臂推到垂直，然后用 AFM 的校准的压电激励器使之弯曲。对应于弯曲度的 $Z$(nm) 和 $V$(V) 能被直接测定。一般 $V^2$ 在时间域中不被评估，但是通过时间信号 $V(t)$ 的傅里叶变换转换为频率域。这个方法可以对引起悬臂移动的低频机械噪声（非热的）进行估计和排除。在商业仪器中，通过拟合 Lorentzian 曲线到悬臂偏转幅度的噪声谱的第一个峰可以在空气或溶液中估计 $V^2$。注意一点，热方法确定的弹簧常数是通过其他方法得到的数值的 10%～20%。

## 用 AFM 进行 SMFS 分析的原理

在样本上覆盖一滴液体，然后黏附到压电定位器上，使它上升，接触到 AFM 的探针尖端。这使分子的未绑定的部分吸附到尖端上。这样，分子在底面和针尖之间形成了桥（图 17-4C）。通常来说，当针尖穿透聚合物刷子时会形成多个桥（图 17-6B），但是通过降低吸附分子的表面密度和针尖与样本接触的时间间隔，可以尽最大可能地限制针尖上吸附的分子数量。通过控制底面逐渐远离针尖，可以控制这些分子伸展，然后当底

面回到针尖时又重新释放。伸展的分子对悬臂有机械力作用，因此会有偏转。这个偏转能够用光电二极管测定，倾斜的激光束使得激光偏离光电二极管中心，从而产生电压变化。力-伸展曲线的实验结果（力谱）反映了一个单分子的弹性。

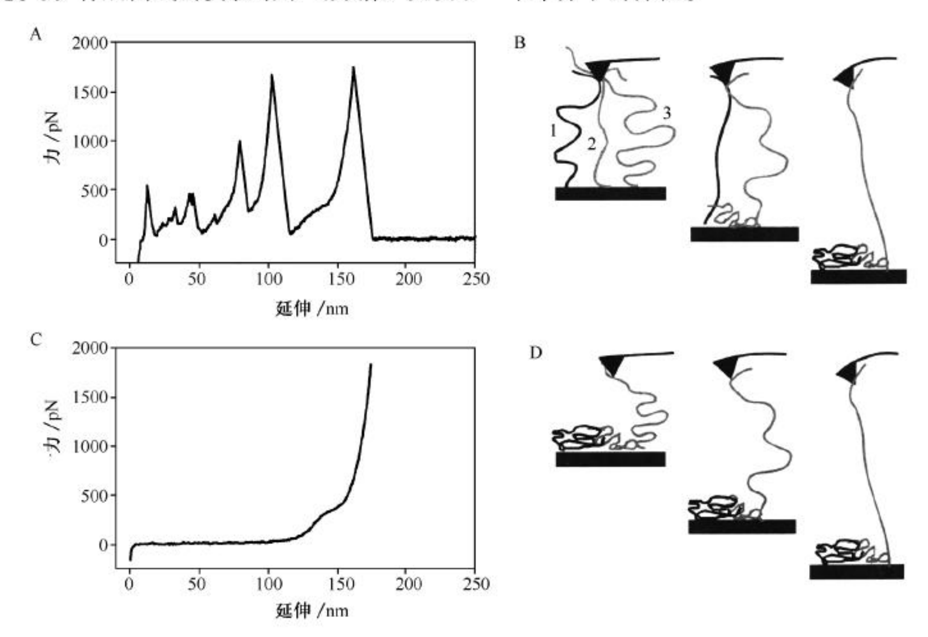



图 17-6 AFM 在水中测量的直链淀粉的力光谱图。A. 力谱图代表不同长度的若干个分子同时（平行）伸展；B. 图 A 所示力谱图的分子构象示意图；C. 单个直链淀粉分子的力谱图；D. 力谱测量的最佳单分子构象。（经许可修改自 Zhang et al. 2005b. © Wiley-VCH）。

实验数据可用于测试聚合物弹性的理论模型。例如，FJC 或 WLC 模型（图 17-1）测量方法表明只有低作用力范围单个多糖分子的弹性符合 FJC 模型，而在较高的作用力，分子的弹性比 FJC 模型中描述的更灵活。它们表现出一些固有的焓弹性，而构象改变又极大地影响了弹性，这些变化可以在反映伸展和扩张的复杂功能的最后的力-伸展曲线中看出来（如右旋糖苷的力-伸展曲线中的平台，图 17-2B 和图 17-4B）（Rief et al. 1997a；Marszalek et al. 1998）。

## 利用 AFM 检测多糖弹性

设计单分子水平的多糖力学的研究，考虑以下几点是非常关键的。

• 样本纯度：大多数多糖是天然产物，经粗糙的方法进行萃取和提纯。但要小心在单分子测量中可能会检测到杂质，从而干扰目的分子的检测。随着各种多糖的单分子力谱图库的日益增加，力谱可以被用于鉴定至少一部分的杂质（Marszalek et al. 2001）。

• 溶解度：一般来说多糖的力学性质，尤其是趋向形成链内氢键的力学性质（如直链淀粉和果胶），依赖于进行力谱测定所用的溶剂的性质。大多数糖溶于水，但这可能并不比在二甲基亚砜 DMSO 或二甲基碳酸盐 DMC 中的溶解性好。一些像直链淀粉之类的多糖可以溶于加热至 90℃的 10%的 NaOH 水溶液中，但其他如甲基纤维素之类

的更易溶于冷水。对于提供的一种多糖，我们可以将它溶于一种溶剂，等分子黏附到玻璃表面后再在另一种溶液中进行力谱测定，然后，通过将分子从表面拉到溶液相来研究多糖的溶液力学性质（Zhang et al. 2006）。

• 聚合：大多数多糖会形成复杂的分子网络和胶（如广泛使用的琼脂糖和角叉胶）。对于一些多糖即使在浓度很稀的溶液中也会形成分子联合。因此，在研究这样的多糖时，准备极度稀释的样本（浓度<0.01%～0.001%，*m/V*）来避免一些不清楚的分子复合物的伸展是非常关键的。

• 分支：许多多糖在沿着主要聚合物骨架的规则或不规则的位置上都有分支。一些分支（右旋糖苷）很短，由1～3个糖环构成，它们不会影响骨架的力学性质。但空间上又长又不规则的分支会引起力谱测定的问题，因为在一个给定的实验中不能清楚地知道分子的哪个部分是伸展的。

• 杂多糖：很多多糖由不同的糖的二糖和三糖的重复单位组成，或者甚至是许多糖的低规则序列组成。这些糖中的一部分可能构象稳定，而其他部分可能会在力作用下伸展而引起构象转变。典型的赤道方位糖苷键连接的糖（如纤维素中的β-D-吡喃型葡萄糖）的构象稳定，而带有一个或两个轴向糖苷键相连的糖则倾向于较高能级下的受力转变，并形成更加伸展的构象，提供了糖苷氧原子（如直链淀粉中的α-D-吡喃型葡萄糖）间的更大分离。因此，在解释杂多糖的力谱图时，必须要意识到可能只有部分单元参与了受力构象转变。

# 实验方案 2：单个多糖力-伸展曲线的测量

本方案介绍了利用 AFM 进行多糖链的伸展-释放的测定。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

### 试剂

盐酸（HCl；1 mol/L）＜!＞
过氧化氢（$H_2O_2$；30%）＜!＞
供研究的多糖

### 设备

AFM 悬臂（如来自 Veeco、Asylum Research 或 Olympus，Inc.）
AFM 仪器（商业化的或自制的；见实验方案 1）
双面胶
玻璃底面（围绕玻璃盖玻片；直径 15 mm；Ted Pella，Inc.）
磁力样本固定器（Ted Pella，Inc.）

## 方法

1. 按照生产商提供的方法准备供研究的多糖溶液。
   实验确定溶液的浓度。在储备液浓度很低的情况下，0.01%～0.001%（*m*/*V*），SMFS 测量大部分的直链多糖是成功的，而对于右旋糖苷来说，则在较高浓度 1%～10%（*m*/*V*）下更好。
2. 清洁玻璃底面用于结合多糖分子。
   i. 将盖玻片在 1 mol/L 盐酸中煮沸 10 min。
   ii. 将盖玻片在 30%过氧化氢中煮沸 30 min。
   iii. 用水仔细漂洗盖玻片。
3. 把 50 μl 多糖溶液堆放在玻璃底面上，使多糖分子黏附到玻璃表面直到样本脱水为止。
4. 用强水流冲洗玻璃底面，去除表面多余分子。使表面干燥。
5. 用双面胶把另一个玻璃底面（上面没有样本）固定在一个磁力样本固定器上。把它放到 AFM 仪器中。
   这将被用于测量弹簧常数。
6. 把 AFM 悬臂安装到悬臂固定器或者 AFM 槽上。用热方法（见上，校准 AFM 悬臂的弹簧常数）或者生产商提供的程序（如果使用商业化的仪器）来测定它的弹簧常数。

为了测定光电二极管对悬臂弯曲程度的敏感性，通常将悬臂压靠在一个干净的、硬的底面上，而不是测量的样本。吸附在底面上的聚合物刷子可能在悬臂下产生，这个作用会降低悬臂垂直方向弯曲的幅度。但是，当悬臂接触到一个硬的底面时，则可假设它的弯曲度正好等于压电激励器的移动，这推动了样本靠向悬臂并使它弯曲。

7. 把干净的底面从 AFM 上移去，然后将它替换成步骤 4 的玻璃底面。
8. 使悬臂尽可能轻地接触样本。用粗和细的微螺丝把样本移向悬臂（或反过来），然后用电脑控制慢慢精细地移动样本（或悬臂）。

   使用不同方法接触样本。使悬臂和样本的接触尽可能地轻是至关重要的（接触力＜500 pN），因为使悬臂插入到样本很可能会引起相当数量的物质吸附到 AFM 尖端，使后续的测量更加困难（尖端和样本之间的吸附力将会增加）。典型的商业化仪器会执行一个自动的程序去“招募”悬臂。在一些仪器中，样本向悬臂移动，而其他则是悬臂向样本移动。
9. 进行伸展-释放测量。有两种方法可以得到力-伸展数据，这依赖于样本和悬臂的开始位置。
   i. 参照第 8 步介绍的方法使样本和悬臂之间接触。给 piezo 一个斜升电压，移动样本远离悬臂（伸展部分），然后重新将样本移回接触悬臂（松弛部分）。
   ii. 悬臂和样本起初是分离的。为了进行测量，把样本移向悬臂形成接触（进入或松弛部分）。然后把样本远离悬臂（收缩或伸展部分）（见排疑解难部分）。

   最重要的因素是每个轨迹采集到的数据点的数量（越多越好）和 piezo 移动样本的速度。在给定速度下，数据采集界面对可能采集到的数据数量有限制。对于给定的一套实验，需保持 piezo 速度不变，因为，改变速度可能会影响结果，特别是当伸展不平衡的时候（相反，蛋白质实验中改变扩展/松弛比率是有利的）。
10. 检测初始记录来确定最佳的 SMFS 条件，并收集多个数据集。

   SMFS 实验的成功率一般比较低。在一个“好实验日”可能会记录到一些单分子的力-伸展曲线。但是假如给定的分子很强地粘在 AFM 针尖（这个机会非常少）上，那就有可能对同一个分子进行许多伸展和释放的记录，在短时期内积聚数十个力-伸展曲线。如果这种小概率事件发生，那么这个实验应该继续进行，使悬臂稍高于（约 5 nm）样本表面轻轻执行伸展-释放步骤。避免悬臂和样本表面的接触，能确保没有新的分子被 AFM 尖端捕获或干扰目的分子的测量。当然，获取样本的其他分子的独立记录也是很重要的，能确保数据集的再现和一致。

## 排疑解难

**问题**：悬臂和底面界面的激光光线反射被干扰，产生不稳的力基线。

**解决方法**：为了消除这个光学干扰，移动悬臂/底面直到干扰消失为止。如果这样做不能解决问题，就重新把激光束聚焦到悬臂上稍微不同的一个点。记住在移动后（光电二极管的敏感性会改变）重新校准悬臂。如果两种方法都不满意，可以考虑改变 AFM 上的激光二极管电子束源（见实验方案 1 列出的设备中可聚焦激光和光学系统部分）。

**问题**：光电二极管总信号（“A＋B＋C＋D”）突然改变或到零。

**解决方法**：如果把悬臂过度地压在底面上，会造成明显的弯曲，使得它的激光束反射远离分离二极管的中心，移动 piezo 和悬臂使它们互相远离可以恢复光电二极管信号。这个影响也有可能是由于 AFM 槽中的溶剂蒸发从而引起激光束光径的改变，可把悬臂从底面上升再补充溶剂解决问题。如果有必要，可以纠正光电二极管的位置，重新获得一个最大“A＋B＋C＋D”信号的激光束的中心。

**问题**：AFM 探针尖端没有吸附到任何分子。

**解决方法**：在某些实验中，AFM 针尖要吸附到分子是很困难的。如果测量时先把针尖靠近样本，然后再从样本收回，那么就把程序反过来操作：用最大为 20 nN 的力压悬臂使其接触多糖样本（对于蛋白质最大的力为 2 nN，见实验方案 3）。等待几秒钟，使分子黏附到针尖上后分开悬臂和样本，然后再把它们放回到一起建立接触，为后续的拉出做准备。如果仍不能解决问题，就应更换悬臂。如果一个新悬臂还是不能吸附任何分子，就增加多糖（或蛋白质）的浓度以及实验的孵育时间来增加吸附在玻璃/金上分子的数量。如果这样也没有帮助，就采用不同的底面（如刚裂开的云母或刚脱水的金）。

**问题**：AFM 探针尖端吸附了太多的分子。

**解决方法**：在某些实验中，AFM 针尖吸附了过多的分子，产生复杂的、带有反映分子陆续随机离开尖端的很多不规则的力峰的力-伸展曲线（图 17-6A 和图 17-8A）。为了减少 AFM 针尖吸附的分子数量，需要更换悬臂，因为旧的尖端很可能在以前的实验测量中积聚了一些分子。一个积聚了某些分子的“脏”的针尖会导致非特异性吸附分子数量的显著增加，并增加了黏附强度。如果新的针尖还是吸附了过多的分子，则应降低原始溶液的分子浓度，让针尖在稀释液中吸附分子。如果测量时是把悬臂从样本上移开然后再放回去，那么就把程序反过来操作（先把悬臂移向样本使它们短暂接触后再移回），这会降低针尖吸附分子的概率。

**问题**：AFM 针尖和样本之间的黏合阻止了测量。

**解决方法**：针尖和样本之间存在很强的黏合力是非常普遍的，有时候会超过 5 nN，这么强的相互作用会干扰目的分子的测量。通过采用将针尖移到样本上不同的点来消除这个作用。如果这样也不解决问题，建议更换悬臂。

## 多糖的力和伸展关系的解释

在单分子 AFM 的力谱研究中，有一个关键点是要区分获得的记录是从单分子来的还是从多个分子来的，是否存在 AFM 针尖与基底非特异性黏附作用。选择要分析的记录时，有必要制定一套统一的规则来减少多个分子在同一时间伸展的错误案例。也有必要应用无偏办法，以免只选择符合某一种期望的记录。这种看起来很复杂的情况由下面的例子来进行说明。

图 17-6 显示了 AFM 在水中测量的直链淀粉的力谱力-伸展关系，该图说明了基底和 AFM 针尖之间不同分子排列产生不同的力谱。图 17-6A 轨迹表示有若干个淀粉分子吸附到 AFM 针尖并同步（平行）伸展得到的力-伸展曲线，分子排列见图 17-6B。值得注意的是 AFM 针尖吸附的分子片段长度不同，这是因为天然多糖是不同聚合物的多分散体，分子质量差异很大。此外，AFM 针尖在随机位置捕获这些片段，因此每个片段

的轮廓长度是不同的。当基底远离针尖，最短的片段（图 17-6 标记为“2”）首先拉伸，而其他两个分子仍然处于松弛状态，只产生很小的力。在某个伸展/力作用下，最短分子和针尖的结合断裂，而基底和针尖之间的其他两个分子继续拉伸（图 17-6 标记为“1”和“3”）。这种情形产生一个机械的复杂系统，形成了复杂且难以解释的有多个重叠力峰的力谱图（图 17-6A）。

然而，当针尖和基底之间只有一个分子时（图 17-6D），该力谱表征为一条平的基线紧跟着一个力峰（图 17-6C）。这种谱图是单分子的特征图且分子伸展标准化后重叠非常好（见下文伸展的标准化处理）。在一个多糖链力谱大约 300 pN 作用力处有一个明显的平台（图 17-6C），这表明分子额外伸展（过度伸展）了约原始轮廓长度的 20%。这平台是由于糖环构象从椅式翻转到船式引起的。平台宽度随分子长度缩放，所以伸展标准化后，不同记录得到的平台会重叠得很好。

## 伸展的标准化处理

图 17-7A 显示了两个独立实验得到的两条单分子葡聚糖（dextran）的力-伸展曲线。图中可以看出片段的轮廓长度明显不同。为了比较这些记录，分子的伸展数值必须经过标准化。FJC 模型（图 17-1A）指出链伸展 $X$ 在力 $F$ 作用下，与聚合物轮廓长度 $L_C$ 成比例。因此，当 FJC 的伸展 $X$ 除以 $X(F_0)$ 时［$X(F_0)$ 是 $F_0$ 作用下的伸展］，伸展和力的关系与链轮廓长度 $L_C$ 无关。$F_0$ 标化后伸展数值为 1，其他力作用下的伸展则成为 $F_0$ 作用下伸展的百分数（图 17-7B）。从几个记录中选择 $F_0$（如一套力谱的最大常见力）标准化每个记录，这样一组记录就可以进行比较了。

一般来说，无论长度如何，同一类型聚合物的记录标准化后重叠得相当不错（图 17-7B）。图 17-7B 中标准化记录之间的小偏差是测量误差引起的，误差中最重要的因素是悬臂弹簧常数的校准。聚合物如葡聚糖或直链淀粉在作用力下会引起构象转变，轮廓长度 $L_C$（除延长 $X$ 外）变得与力有关。因此，当标准化和比较直链淀粉或葡聚糖的记

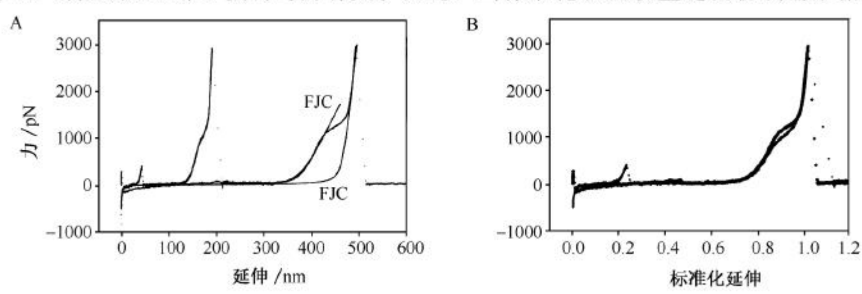



图 17-7 伸展标准化以及叠加前（A）后（B）水中葡聚糖的力-伸展曲线。一条记录的起始小峰可能代表了一较短分子从针尖脱离；它并没有显著影响这些测量，可以忽略不计。（A 图中的实心光滑线）FJC 符合力-伸展数据。平台前特征由 $l_K$ = 0.5 nm，$L_{C1}$ = 376.4 nm，$k_{segment1}$ = 15 000 pN/nm获得。平台后特征由 $l_K$ = 0.5 nm，$L_{C2}$ = 466.1 nm，$k_{segment2}$ = 95 000 pN/nm 获得。平台特征代表糖环结构由通常的椅式翻转成船式，且 C5-C6 同步重定位（Lee et al. 2004a）。耦合的力引发的构象转变使葡聚糖的轮廓长度增加了约 24%（相比于其初始长度）。因此，多糖力谱 FJC 模型中平台或其他偏离通常指示了糖环和（或）链二级结构中力引发的构象转变。

录时，很重要的一点是从进行比较的一套曲线中选择尽可能大的常见力 $F_0$，在这个作用力下，每个分子均已完成构象转变。

### 用力谱鉴定多糖力诱导的构象转变

在观察多糖力谱时应该确定它们是否符合或偏离熵弹性 FJC 模型。偏差可能指示糖环或多糖链二级结构中力引发了构象转变。通常情况下，糖环的转变是完全可逆的，产生重叠很好的拉伸和松弛力谱，而二级结构的转变（如单或双螺旋的解旋）产生的拉伸和松弛力谱有不同程度滞后。

此外，糖环构象转变产生的平台长度通常与参与构象转变的糖环数目成正比，转而与分子的轮廓长度成正比：分子越长，平台期越长。除非多糖形成非常常规的二级结构如 V 型直链淀粉螺旋（Zhang et al. 2006），二级结构的影响可能会产生非常规平台特征，平台长度与分子长度不成比例（Li et al. 1999）。对于 V 型直链淀粉，螺旋的拉伸和松弛在作用力 50 pN 时产生一个平台期，其长度和直链淀粉的轮廓长度成比例。

如果发现有偏差（平台期），各偏差特征前后用 FJC 模型拟合（图 17-7A 第二条力曲线）来估算多糖轮廓长度的变化。这种特征通常表明一些力引发的糖环或链结构内的构象转变，使轮廓长度改变与可能的糖环构象转变（如船式结构、倒椅式结构，或不同的 C5-C6 旋转异构体）相互关联就显得尤为重要。计算机模拟（量子力学或经典分子动力学）研究有助于确定这种力引发的构象转变（Lee et al. 2004b，c；Zhang and Marszalek 2006）。

## 利用 AFM 检测蛋白质力学

假设研究者能够设计、构建、表达和纯化一种目的蛋白质，并用 SMFS 研究它的力学特性。由若干个独立折叠域构成的模块蛋白（$n \geqslant 5$），如肌联蛋白、肌腱蛋白、纤维结合蛋白、钙黏着蛋白或者血影蛋白等的结构都是单分子力谱分析理想的模型系统。因为它们能产生高度重复的力谱图，这个力谱具有规则的锯齿模式，能与平行装配的未知数量分子或变性蛋白中测得的力谱图轻易地区分开来（图 17-8）。如先前所说，如果小的单域蛋白侧面与其他域相接，而这些域在混合蛋白的力谱图中能产生一个特异的力学指纹（图 17-3 D），那么用 AFM 力谱也可能检测小单域蛋白的力学性质。

单个蛋白（模块或单域）的力谱在低伸展力的作用下可以鉴定出它们的熵弹性，并能通过把 WLC 模型拟合到力-伸展曲线来确定它们的持续长度。较高的伸展力作用会拆开蛋白质，进而可以研究它们的机械强度，确定展开和重折叠性质。这提供了展开和重折叠比率的数据，以及沿着展开反应坐标的过渡构象位置的相关数据，这个位置被定义为沿着作用力方向的蛋白质模块的伸展（Rief et al. 1997b；Carrion-Vazquez et al. 1999）。因此，单蛋白力谱分析能产生许多有趣的数据，这是传统的生物物理方法所不能及的。

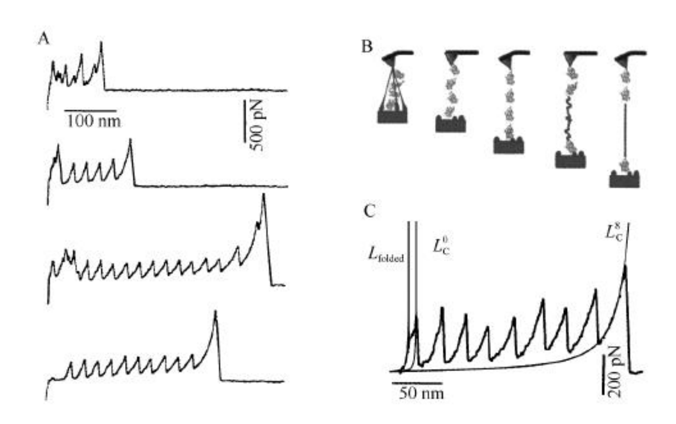



图 17-8　AFM 测量的模块蛋白的伸展。A. 从一个具有 12 个同样结构域的纯蛋白质样本中获得的 4 个力-伸展曲线。每个例子的最后一个峰表示蛋白质完全展开以及它与悬臂或者底物的分离。注意第一个轨迹中分离前的力峰幅度和间隔是不规则的模式，因此是无法解释的。但是在后面的轨迹中，有不同数目的相近幅度、均匀间隔的峰（与连续蛋白质域的展开结果对应），有或没有一个非特异性作用的早期区域。B. AFM 实验中底面撤回时发生的事件的示意图。首先悬臂与其他分子如变性蛋白（深色）等相互作用后发生偏转。当这些作用中断后悬臂上的力释放出来。当模块蛋白（浅色）进一步伸展，悬臂上的力就会增加，直到其中一个域拆开（弯曲的灰线）使悬臂上的力下降。当未折叠域完全伸展（直的灰线）时力重新增加。C. WLC 模型能被用于拟合在所有域展开之后（$L_c^8$）或任何展开时间之前（如第一个域展开之前，$L_c^0$）的蛋白质力-伸展关系。第一个拟合（$L_{folded}$）表示一个展开域出现之前的蛋白质的伸展（图 17-3B）（改自 Fisher et al. 2000）。

## 实验方案 3：用 AFM 测量蛋白质力学

本实验方案介绍了在不变的伸展比率范围内使用 AFM 对蛋白质力学进行测量。研究者致力于应用更多先进的方法，如力谱的力-斜线上升或力-夹钳形式等进行研究，可以参考介绍这些方法的原始论文（Oberhauser et al. 2001；Fernandez and Li 2004）。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

#### 试剂

铬<!>或铬/镍粉<!>（Goodfellow）

金颗粒（金属丝；Goodfellow）

金是许多蛋白质力谱分析的底面的最好选择。蛋白质能很强地吸附到金表面且不会变性（显著的）。而且 AFM 尖端非常容易“捡起”吸附在金颗粒上的蛋白质。

盐酸（HCl；1 mol/L）<!>

过氧化氢（$H_2O_2$；30%）<!>

磷酸缓冲盐（PBS）片剂（Sigma-Aldrich）

供研究的蛋白质（−70°C 保存）

#### 设备

AFM 悬臂（如来自 Veeco，Asylum Research 或 Olympus，Inc.）

AFM 仪器（商业化的或自制的；见实验方案 1）

玻璃底面（围绕玻璃盖玻片；直径 15 mm；Ted Pella，Inc.）

真空金属脱水器

### 方法

1. 清洁玻璃底面用于结合蛋白质分子。
   i. 将盖玻片在 1 mol/L 盐酸中煮沸 10 min。
   ii. 将盖玻片在 30%过氧化氢中煮沸 30 min。
   iii. 用水仔细漂洗盖玻片。
2. 在真空中，在底面上放一层铬或铬-镍混合物（10～20 nm），然后蒸发上 40 nm 的一层金，这样就制备好了金包裹底面。
   金不会黏附在没有铬覆盖的玻璃底面上。
3. 配制供研究的蛋白质溶液。
   蛋白质通常溶解在 PBS 中。实验确定蛋白质溶液浓度。对于分子质量大小为 100～150 kDa 的蛋白质分子来说，合理的浓度范围是 10～100 μg/ml。

4. 滴 50 μl 蛋白质溶液到金包裹的玻璃基底。放置 20 min 让分子吸附到其表面。
   虽然可以使用更先进的方法让蛋白质共价交联到底物上，但是大多数情况下简单的蛋白质吸附法仍是很奏效的。许多蛋白质力谱的原创性文章都使用这种简单有效的方法。
5. 在金表面滴 50 μl 新鲜的 PBS 除去未结合的蛋白质。用移液器吸头吸去表面多余液体，小心吸头不要触及金表面。
6. 测量悬臂的弹性常数（见实验方案 2，步骤 5 和步骤 6）。
7. 将步骤 5 制备的基底放在原子力显微镜上。使悬臂接触到样本（见实验方案 2，步骤 8）。
   务必轻柔地放置悬臂。
8. 执行拉伸-释放测量，让 AFM 针尖靠近或远离样本（见实验方案 2，步骤 9）。
   尝试各种实验条件以最大限度提高捕获单个蛋白质的机会。包括原子力显微镜针尖接触吸附蛋白质层的时间间隔：过长时间接触可能会增加超过一个分子黏附在针尖上的概率，而过短接触时间可能会导致没有吸附。
9. 检查初步记录，寻找单个蛋白质的力学指纹。
   通常情况下，由 WLC 拟合发现独立折叠的模块蛋白质的力-伸展关系显示出常规去折叠力峰锯齿波，有类似的幅值和间距（比较图 17-3B 和图 17-3C；见 17-8 单分子和多分子力-伸展曲线例子）。由于模块蛋白质的功能域有不同的力学稳定性，可能会产生更复杂的模式。这种蛋白质力峰的幅值将逐渐增加，因为较弱的功能域去折叠较早（较低的拉伸力），而较强的功能域去折叠较迟（更高的拉伸力）。对于单功能域蛋白质，可利用杂合构建辅助蛋白质柄的力学指纹来确定单分子记录（图 17-3D）。
10. 确定 SMFS 的最佳条件，收集多套数据。
    必须意识到单个蛋白质记录的成功率在 1%～5%，甚至更少。然而，在极少情况下，如果某一蛋白质强吸附在原子力显微镜针尖上，就有可能产生同一分子许多伸展和释放记录，在很短的时间内积累数十个力-伸展曲线。如果这种情况发生，参照实验方案 2，步骤 10 继续进行测量。
11. 检查黏附在针尖准备随时重折叠的模块蛋白质重折叠动力学。蛋白质的重折叠速率常数由如下双脉冲流程来确定。
    i. 施加第一个作用力，在力-伸展曲线上计算去折叠力峰数 $N_0$。
    ii. 等待一定的间隔时间 $\Delta t_1$。
    iii. 施加第二个伸展脉冲，在第二个力-伸展曲线上计算去折叠力峰数 $N_1$。
    iv. 增加 $\Delta t_i$，重复步骤 11 i～iii，确定 $N_i/N_0$ 如何依赖于 $\Delta t_i$（见下，重折叠动力学）。
12. 检查模块蛋白的去折叠动力学。Evans 和 Ritchie（1997）表明了在没有作用力 $k_{u0}$ 以及过渡状态 $\Delta X_u$ 情况下某一蛋白质的去折叠速率常数依赖于去折叠力的负荷率（独立于去折叠力的分布）。
    i. 随后的伸展-释放测量，增加蛋白质伸展率从 0.01 nm/ms 到 10 nm/ms。确定平均去折叠力如何依赖于这个速率（见下文去折叠动力学）。

ii. 利用定速伸张得到的力-伸展曲线构建去折叠力直方图。去折叠力可从锯齿波的峰值得到。

最后一个锯齿力峰值往往不代表去折叠而是分子脱离；在这种情况下，最后一个力峰不应列入数据集。

## 排疑解难

见实验方案 2 的排疑解难。

### 解释蛋白质力与伸展的关系

图 17-8 显示了有 12 个重复 I27 域的纯肌联蛋白样品的力-伸展曲线的例子（Fisher et al. 2000）。通过研究这些力曲线，显示图 17-8A 记录到的不规则的力峰是由于同时有几个分子吸附在原子力显微镜探针尖端然后顺序去折叠和（或）从针尖（或基底）脱离造成的。这样的记录非常难解释。但是剩下的记录显示了高度的规律性和可重复性，而且可以互相叠加，说明它们来自相同的单分子。唯一的区别在于这些记录每个轨迹的第一部分（代表针尖和基底的非特异性相互作用）和去折叠力峰的数目（对应于原子力显微镜针尖随机捕捉的不同蛋白质片段）。

规则的描述力学性能的力-伸展曲线可进一步分析。单个（模块）蛋白质得到的锯齿状力-伸展曲线符合单一持续长度得到的一组 WLC 曲线。这由同样的递增 $\Delta L_c$ 顺序增加轮廓长度 $L_c$ 来实现（图 17-3B，C）。$\Delta L_c$ 与“隐藏”在折叠中的氨基酸数目严格相关（不是直接暴露于拉伸力），只有模块拆开才释放出来。假设每一个氨基酸对多肽链轮廓长度贡献 0.365 nm（Dietz and Rief 2004），$\Delta L_c$ 表示某个模块完全伸展的多肽链的总长度 $n\times0.365$ nm（$n$ 是模块中氨基酸的数目）之间的差异，模块的初始长度形成了折叠蛋白的轮廓长度。从 WLC 模型得到的 $\Delta L_c$，从序列计算得到的 $\Delta L_c$，以及从 X 射线晶体学和 NMR 数据（如果有的话）得到的折叠模块的大小，是很好的单分子蛋白质记录的质量指标。

### 重折叠动力学

在双脉冲实验中（实验方案 3，步骤 11），施加第一个力 AFM 针尖捕获的模块的数目可以在力-伸展曲线上计数去折叠力峰 $N_0$ 得到。时间间隔 $\Delta t_1$（在此期间蛋白质保持完全松弛状态）后施加的第二个脉冲产生的锯齿波去折叠力峰 $N_1$ 的数目小于或等于第一脉冲的峰数目 $N_0$。因此第二个脉冲确定了 $\Delta t_1$ 重新折叠的模块数目。

重复这些测量同时增加 $\Delta t_i$ 就有可能确定所研究蛋白质的重折叠动力学。简单情况下，代表 $\Delta t_i$ 期间模块重折叠（$\Delta t_i$ 的功能）的重折叠曲线是一次指数方程（双态系统）。数据符合方程 $P_f(t)=1-\exp(-tk_{f0})$，式中，$P_f$ 是重折叠（$N_i/N_0$）的概率；$k_{f0}$是无作用力时重折叠速率常数（Rief et al. 1997b；Oberhauser et al. 1998；Carrion-Vazquez et al. 1999）。

### 去折叠动力学

虽然改变伸展率有利于确定 $k_{u0}$ 和 $\Delta X_u$，但仪器漂移和悬臂流体动力效应限制了模

块蛋白伸展率在 0.01～10 nm/ms 范围内（Carrion-Vazquez et al. 1999）。为了确定 $k_{u0}$ 和 $\Delta X_u$，将实验数据（代表平均去折叠力和伸展率之间的关系）与从 Monte Carlo 去折叠动力学模拟获得的数据（其中参数取决于 $k_{u0}$ 和 $\Delta X_u$）相拟合。有关 Monte Carlo 模拟的详细介绍参见 Rief 等（1997b）论文中的图 5。

单独构建定速伸张去折叠力直方图（见实验方案 3，步骤 12 ii），将实验数据与 Monte Carlo 去折叠动力模拟相拟合以确定 $k_{u0}$ 和 $\Delta X_u$（Rief et al. 1997b；Carrion-Vazquez et al. 1999；Dietz and Rief 2004；Dietz et al. 2006）。这两种过程应该得到一致的 $k_{u0}$ 和 $\Delta X_u$。假定去折叠力峰可以准确地从力-伸展曲线上确认，并且去折叠力直方图可以构建，那么这些过程还可以用于检测单功能域蛋白（Dietz and Rief 2004；Dietz et al. 2006；Perez-Jimenez et al. 2006）。

## 致谢

P. E. M. 得到了美国国家科学基金会 MCB 部门和美国国立卫生研究院 R21 基金资助。M. R. 得到了国家科学基金会的 IGERT 奖学金资助。

## 参考文献

Baumgartner W., Hinterdorfer P., Ness W., Raab A., Vestweber D., Schindler H., and Drenckhahn D. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 4005–4010.

Best R.B., Li B., Steward A., Daggett V., and Clarke J. 2001. Can non-mechanical proteins withstand force? Stretching barnase by atomic force microscopy and molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **81:** 2344–2356.

Binnig G., Quate C.F., and Gerber C. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56:** 930–933.

Bustamante C., Macosko J.C., and Wuite G.J.L. 2000. Grabbing the cat by the tail: Manipulating molecules one by one. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1:** 130–136.

Bustamante C., Marko J.F., Siggia E.D., and Smith S. 1994. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* **265:** 1599–1600.

Butt H.J., Cappella B., and Kappl M. 2005. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* **59:** 1–152.

Carrion-Vazquez M., Oberhauser A.F., Fowler S.B., Marszalek P.E., Broedel S.E., Clarke J., and Fernandez J.M. 1999. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: A comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 3694–3699.

Dietz H. and Rief M. 2004. Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 16192–16197.

Dietz H., Berkemeier F., Bertz M., and Rief M. 2006. Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 12724–12728.

Evans E. and Ritchie K. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **72:** 1541–1555.

Fernandez J.M. and Li H.B. 2004. Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **303:** 1674–1678.

Fisher T.E., Marszalek P.E., and Fernandez J.M. 2000. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* **7:** 719–724.

Florin E.L., Rief M., Lehmann H., Ludwig M., Dornmair C., Moy V.T., and Gaub H.E. 1995. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosens. Bioelectron.* **10:** 895–901.

Flory P.J. 1953. *Principles of polymer chemistry.* Cornell University Press, Ithaca, New York.

———. 1989. *Statistical mechanics of chain molecules.* Hanser Publishers, New York.

Guerrini M., Guglieri S., Beccati D., Torri G., Viskov C., and Mourier P. 2006. Conformational transitions induced in heparin octasaccharides by binding with antithrombin III. *Biochem. J.* **399:** 191–198.

Howard J. and Bechstedt S. 2004. Hypothesis: A helix of ankyrin repeats of the NOMPIC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr. Biol.* **14:** R224–R226.

Kirby A.J. 2001. The lysozyme mechanism sorted after 50 years. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8:** 737–739.

Law R., Carl P., Harper S., Dalhaimer P., Speicher D.W., and Discher D.E. 2003. Cooperativity in forced unfolding of tandem spectrin repeats. *Biophys. J.* **84:** 533–544.

Lee G., Nowak W., and Marszalek P.E. 2004a. Mechanics of 1,6 linked polysaccharides by AFM and SMD calculations. *Biophys. J.* (suppl. 322A) **86:** 1675-Pos.

Lee G., Nowak W., Jaroniec J., Zhang Q., and Marszalek P.E. 2004b. Nanomechanical control of glucopyranose rotamers. *J. Am. Chem. Soc.* **126:** 6218–6219.

———. 2004c. Molecular dynamics simulations of forced conformational transitions in 1,6-linked polysaccharides. *Biophys. J.* **87:** 1456–1465.

Lee G., Abdi K., Jiang Y., Michaely P., Bennett V., and Marszalek P.E. 2006. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature* **440:** 246–249.

Li H., Rief M., Oesterhelt F., and Gaub H.E. 1999. Force spectroscopy on single xanthan molecules. *Appl. Phys. A* **68:** 407–410.

Li H.B., Linke W.A., Oberhauser A.F., Carrion-Vazquez M., Kerkviliet J.G., Lu H., Marszalek P.E., and Fernandez J.M. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* **418:** 998–1002.

Marszalek P.E., Li H.B., and Fernandez J.M. 2001. Fingerprinting polysaccharides with single-molecule atomic force microscopy. *Nat. Biotechnol.* **19:** 258–262.

Marszalek P.E., Oberhauser A.F., Pang Y.P., and Fernandez J.M. 1998. Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature* **396:** 661–664.

Marszalek P.E., Pang Y.P., Li H.B., El Yazal J., Oberhauser A.F., and Fernandez J.M. 1999a. Atomic levers control pyranose ring conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7894–7898.

Marszalek P.E., Lu H., Li H.B., Carrion-Vazquez M., Oberhauser A.F., Schulten K., and Fernandez J.M. 1999b. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* **402:** 100–103.

Oberhauser A.F., Badilla-Fernandez C., Carrion-Vazquez M., and Fernandez J.M. 2002. The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM. *J. Mol. Biol.* **319:** 433–447.

Oberhauser A.F., Hansma P.K., Carrion-Vazquez M., and Fernandez J.M. 2001. Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 468–472.

Oberhauser A.F., Marszalek P.E., Erickson H.P., and Fernandez J.M. 1998. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* **393:** 181–185.

Perez-Jimenez R., Garcia-Manyes S., Sri Rama Koti A., and Fernandez J.M. 2006. Mechanical unfolding pathways of the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) revealed by single-molecule force spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **281:** 40010–40014.

Rief M., Oesterhelt F., Heymann B., and Gaub H.E. 1997a. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science* **275:** 1295–1297.

Rief M., Pascual J., Saraste M., and Gaub H.E. 1999. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: Low unfolding forces in helix bundles. *J. Mol. Biol.* **286:** 553–561.

Rief M., Gautel M., Oesterhelt F., Fernandez J.M., and Gaub H.E. 1997b. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276:** 1109–1112.

Rugar D. and Hansma P. 1990. Atomic force microscopy. *Phys. Today* **43:** 23–30.

Smith S.B., Cui Y.J., and Bustamante C. 1996. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* **271:** 795–799.

Sotomayor M., Corey D.P., and Schulten K. 2005. In search of the hair-cell gating spring: Elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* **13:** 669–682.

Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R., and Withers S.G. 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412:** 835–838.

Williams P.M., Fowler S.B., Best R.B., Toca-Herrera J.L., Scott K.A., Steward A., and Clarke J. 2003. Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* **422:** 446–449.

Zhang Q.M. and Marszalek P.E. 2006. Identification of sugar isomers by single-molecule force spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128:** 5596–5597.

Zhang Q.M., Lee G.R., and Marszalek P.E. 2005a. Atomic cranks and levers control sugar ring conformations. *J. Phys. Condens. Matter* **17:** S1427–S1442.

Zhang Q.M., Jaroniec J., Lee G., and Marszalek P.E. 2005b. Direct detection of inter-residue hydrogen bonds in polysaccharides by single-molecule force spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44:** 2723–2727.

Zhang Q., Lu Z., Hu H., Yang W., and Marszalek P.E. 2006. Direct detection of the formation of V-amylose helix by single molecule force spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128:** 9387–9393.

（沈　逸　朱丽君　译）

# 第18章　用纳米孔技术进行核酸及DNA-蛋白质相互作用的单分子研究

**Meni Wanunu　Amit Meller**

Department of Biomedical Engineering and Department of Physics,
Boston University, Boston, Massachusetts 02215

## 摘要

纳米孔是一种能操纵单个未标记的生物分子的敏感的单分子检测器。流过植入绝缘薄膜的单个纳米孔（2～6 nm）的离子电流的阻滞，可以用于记录生物多聚体的转位，如单链DNA和单链RNA，双链DNA和多肽。生物多聚体在纳米孔中的转位是由加在纳米孔两端的电场所驱动的。纳米孔力光谱即应用动态的电压谱来诱导生物分子的构象变化（如DNA的解链或RNA的去折叠）或者测量DNA-蛋白质的相互作用。本章简要地概述了纳米孔的一些应用，详细介绍了用于磷脂包被的蛋白质通道实验以及固态纳米孔装置所需的材料和试剂。然后详述了高分辨低噪声的纳米孔实验的仪器和装置设计。最后讨论了纳米孔的应用前景，包括结合纳米孔和其他单分子技术，例如，光学钳和单分子荧光共振能量转移技术共同研究的优势。

## 概述

凝胶电泳是用于分离核酸和蛋白质最常用的技术之一，并且从中异生出几百种不同的方法应用于生物学和生物化学的各个领域（Cantor and Schimmed 1980）。在凝胶电泳中，带电的生物多聚体在电场的作用下通过由大小为几纳米到几百纳米的孔所组成的异质三维网络。被分析物与孔组成的网络的强烈的相互作用最终被平均化，以达到精细分离非常相似的两类分子。如果放大到单分子水平，目前还不可能预测或跟踪单分子在复杂的胶基质中的迁移轨迹。但是，目前可能做到的是，当被分析的分子通过孔的时候，用探测通过孔的离子电流的间断性变化来定位和检测单个生物多聚体通过单个的、定义明确的、纳米范围的孔（即纳米孔）。

由电泳驱动的生物多聚体通过纳米孔转运动力学可以展现丰富的信息，包括生物多聚体的长度、序列甚至在转位时的方向。当纳米孔的内径比生物多聚体的横截面稍微大一点的时候，分子必须解折叠后才能进入纳米孔。解折叠的过程给生物多聚体转位附加了额外的能障，这种能障的变化可以用来检测微弱的结构基序的变化，如单个核苷酸的错配。并且，当生物多聚体穿过纳米孔时，转位动力学显示了生物多聚体序列的结构信息，包括碱基在多聚核苷酸中的位置、是否存在结合蛋白或者二级结构域。这些研究可以在不同的范围收集数据，从二级结构图谱的绘制到多聚核苷酸的单个碱基的解读。

由电压驱动的多聚核苷酸通过纳米孔转位的物理学原理看起来似乎和这些分子在凝胶电泳中的运动原理相同。然而，两者还是存在很多基本的区别（Meller 2003）。

1. 驱动 DNA 通过纳米孔的电场强度（$10^5$ V/cm）比凝胶电泳中电场强度大约要高 4 个数量级（1～10 V/cm）。

2. 电场只局部作用在位于纳米孔内的生物多聚体的一小部分，多聚体的其他部位都处在电场之外（Meller 2003）。相反地，在凝胶电泳中，整个生物多聚体都是处于一个连续的电场中。

3. 离子的作用（包括带相同电荷和相反电荷的离子）是完全不同的，因为一小部分（但是必须的）被限制在纳米孔内（Jan Bonthius et al. 2006）。

这些因素为识别不同的分子种类以及在单分子水平研究分子的结构提供了可能。

阻力传感（resistive sensing）的概念是基于在一个电导溶液中对粒子进行计数和大小分类，这个方法是由 Coulter 在 20 世纪 50 年代初期发明（Coulter 1953）并且后来由 DeBlois 和 Bean（1970）改进。在 Coulter 计数器中，小的粒子被挤压通过一个内部为绝缘壁（如玻璃）的微米孔。当电压作用于这个微米孔时会在电解液中产生一个离子流。当粒子通过微米孔时，它们暂时置换电解液，导致离子流的短暂阻滞。这种阻滞与每个粒子或一群粒子（如活细胞）的体积大致成正比。

在纳米孔试验中，利用高增益的电流扩增器使 Coulter 计数器的方法能降低到分子水平使用（图 18-1）。当孔径达到纳米水平时，单分子的检测成为可能。幸运的是，有一些膜蛋白通道的孔径大小刚好适合感受单分子。例如，把单个 2 nm 大小的丙甲苷肽通道植入脂质膜中，通过分析加入多聚体前后的离子流噪声谱来检测甘油聚乙烯分子（Bezrukov et al. 1994）。含水的 α-血溶素通道已被用于检测单链 DNA 和单链 RNA（ssDNA and ssRNA）的转位（Kasianowicz et al. 1996），重组的枯草杆菌离子通道也被用

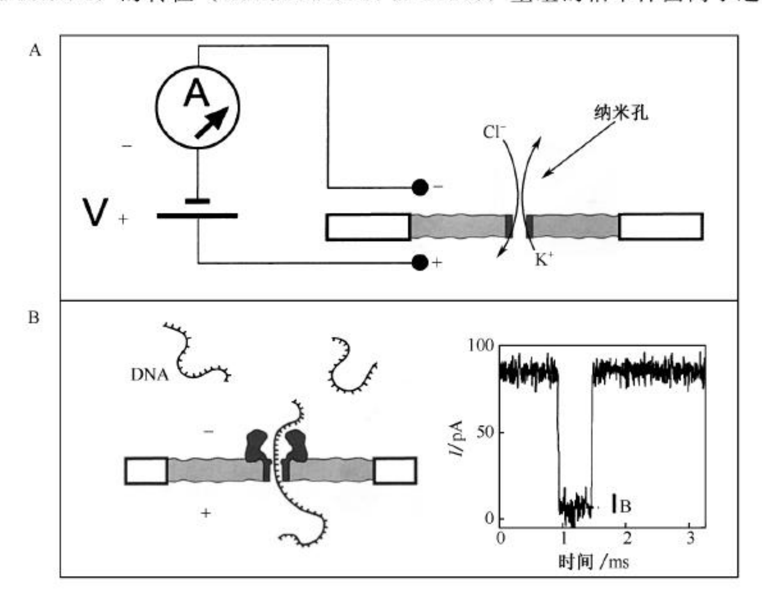



图 18-1　A. 纳米孔测量的概略图，图中流过纳米孔的 KCl 溶液的离子电流通过施加的电压测量。B. ssDNA 通过 α-HL 纳米孔的转位。（插图）电流阻滞事件与单个生物多聚体通过纳米孔（转位）相对应。平均阻滞电流定义为 $I_B$。

于检测双链 DNA（dsDNA）的转位（Szabo et al. 1997）。这些研究奠定了利用纳米孔来进行单分子检测生物多聚体的基础。

有两个原因限制了利用生物通道的单分子分析的发展。第一，脂质膜很脆弱，通常寿命只有几分钟到几个小时。第二，许多生物通道显示出自我门控的特性（由于通道的构象改变而引起电流的波动）。寻找另一种合适的通道用于单分子分析促进了制造合成纳米孔的新方法的发展。以下章节描述了两种系统——蛋白纳米孔以及合成纳米孔，并且讨论它们各自的不足之处和在单分子研究中的应用举例。

## 蛋白质纳米孔实验研究：α-血溶素

α-血溶素（α-HL）是一个由金黄色葡萄球菌分泌的分子质量为 232.4 kDa 的七聚体跨膜通道（Gouaux et al. 1994）。该通道由 7 个水溶性的单链多肽组成，每个多肽的分子质量为 33.2 kDa（Bhakdi and Tranum-Jensen 1991）。在体内，该通道能在不同的细胞类型中诱导凋亡（细胞死亡），包括兔红细胞、人红细胞、单核细胞和淋巴细胞（Bhakdi and Tranum-Jensen1991；Jonas et al. 1994）。诱导细胞凋亡通过两个机制：一是 $K^+$ 内流和 $Na^+$ 外流；二是 α-毒素插入线粒体外膜引起细胞色素 c 释放（Bantel et al. 2001）。

α-HL 的晶体结构为一个蘑菇状的七聚体，由膜外的“帽子”和跨膜的 β 桶状结构组成，其中 β 桶状结构组成了充满溶剂的通道（“茎”），与帽子相连（图 18-2）（Song

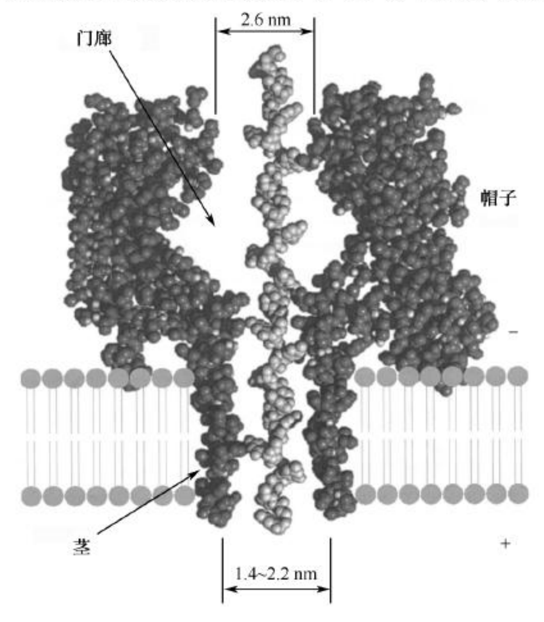



图 18-2　植入脂质的 α-HL 横断面的分子模型，显示了一个 ssDNA 被拉过孔。复合物的茎横跨脂质双层膜。孔的尺寸是基于由 Song 等（1996）确定的相应的蛋白质的晶体结构。入口到通道处的 1.5 nm 的限制孔由交互的谷氨酸和赖氨酸残基组成。（经允许修改自 Deamer 和 Akeson 2000 [Elservier]）

et al. 1996)。帽子宽约 10 nm，内腔开放孔径为 2.6 nm，最大内径为 3.6 nm。β 桶状通道被认为是一个亲水性的通道，入口的限制孔径为 1.5 nm，内径为 1.4～2.2 nm。整个孔径从帽子到茎长大约 10 nm，内腔体积约为 18 $nm^3$。在茎部平均能够容纳约 600 个水分子，当 KCl 的浓度为 1 mol/L 时，该通道大约能容纳 11 个 $K^+$ 和 11 个 $Cl^-$ (Aksimentiev and Schulten 2005)。

α-HL 能在大肠杆菌中表达并且可以通过标准的 SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）方法纯化，因此可商品化获得。在体内，它能在脂质双分子层内自我装配，在 pH7～9 的条件下形成高度稳定的非门控通道。在这些条件下形成的纳米孔是高度可重复的，孔开放电流的差异小于 2%（在温度稳定的条件下）。植入膜的结构非常高效：通道开放电流（$I_{open}$）对温度的依赖性可以解释为预期的大量的离子迁移依赖于温度（见图 18-3A）。这个结果排除了通道的慢（即大规模的）构象变化的可能性，虽然不能排除高频率的波动。单个 α-HL 纳米孔的电流-电压曲线稍微有些不对称，当茎存在部分正偏置时有更大的电导率（见图 18-3B，15℃）。这些观察已经得到证实，考虑到在 α-HL 的茎内不对称的内表面电荷分布，可导致 $K^+$ 以相反的偏差值不同的速率进入 (Noskov et al. 2004; Aksimentiev and Schulten 2005)。α-HL 的通道孔径（内径 1.4～1.8 nm）使它适合用于研究 ssDNA、ssRNA 和短的多肽。

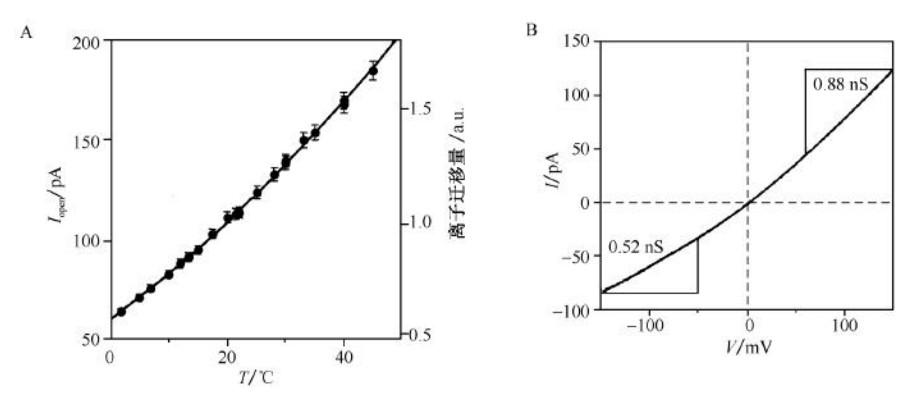



图 18-3 A. 测量单个 α-HL 在 120 mV 正偏置时的孔开放电流（极性见图 18-2）。实线是在用一个恒量测量的 1 mol/L KCl 溶液的迁移率（Meller 和 Branton 2002）。B. 在 15℃ 和 1 mol/L KCl 条件下，测量单个 α-HL 通道的电流-电压（I-V）曲线。电导值显示为向前和向后的偏移。

## DNA 和 RNA 转位

图 18-4A（见图版）显示了多聚脱氧胞嘧啶［poly (dC)$_{60}$］（蓝色）和多聚脱氧腺嘌呤［poly (dA)$_{60}$］（红色）DNA 的典型的转位事件。poly (dA) 的滞留时间（孔电流保持在阻滞状态的时间）比 poly (dC) 明显要长。图 18-4B 显示了在温度为 15℃，电压为 120 mV 的条件下，在 1 mol/L KCl 溶液中，poly (dC)$_{100}$（蓝色）和 poly (dA)$_{100}$（红色）的标化阻滞电流（$I_B$）和滞留时间（$t_T$）的事件图。利用离子电流通过单个的 α-HL 孔时的特征性瞬间阻滞现象可以容易地区分 poly (dA) 和 poly (dC)，见 $t_T$ 的柱状图（图 18-4B 左侧插图）。时间和电流的峰值分布，分别定义为 $t_p$ 和 $I_P$（电

流标化为孔径开放电流），用于描述 DNA 转位过程的特征。如下所述，实验显示特征性的时间 $t_P$ 与 ssDNA 的长度呈线性关系（ssDNA 的长度比孔径长度长，约为 5 nm），提示 $t_P$ 是最可能的 ssDNA 转位时间（Meller et al. 2000，2001；Meller and Branton 2002）。为了避免统计误差，必须要在每种条件下获取大量的单分子事件（通常要大于 1000 个事件）。图 18-4 就是从大约 2500 个事件中获得的柱状图。

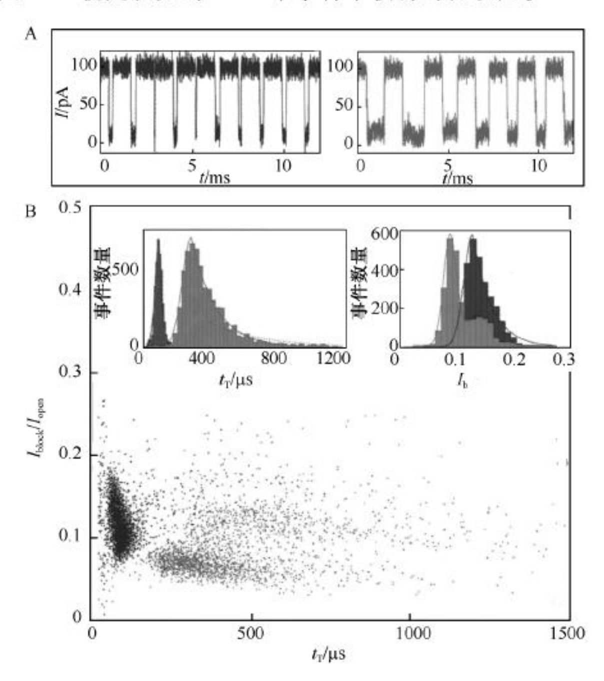



图 18-4　A. 多聚胞嘧啶（蓝色）和多聚腺嘌呤（红色）在 15℃和 120 mV 时通过 α-HL 通道的转位事件。两个同质聚合物长度都是 90 个碱基。在两个事件之间恒定的时间是因为采用了“事件”驱动的记录模式，在这个模式中，每个事件之间有一个孔开放电流的固定时间间隔。B. 将近 5000 个单分子转位事件的代表性统计分析。主图是一个事件图，其中每个数据点对应于一个单一的转位事件，纵坐标为校正阻滞电流，$I_B = I_{block}/I_{open}$，横坐标为转位时间 $t_T$。蓝点为在 20℃和 120 mV时检测的 poly（dC)$_{100}$；红点为在 20℃和 120 mV 时检测的 poly（dA)$_{100}$；插图为 $t_T$（左）和 $I_B$（右）的柱状图。分布最可能的值（峰）分别标为 $t_P$ 和 $I_P$，用于识别转位过程。数据来源于 Meller等（2000）。

图 18-5 显示了对于分子长度大于 α-HL 的通道孔径时（约 5 nm，或 12 个核苷酸），$t_P$ 和 ssDNA 长度（$N$）的依赖关系。很明显，$t_P$ 随着 $N$ 线性增加。poly（dA）的每个碱基的增加时间（$t_P/N$）为 5.2 μs，poly（dC）为 2.2 μs（15℃）。poly（dA）的 $t_P/N$ 是 poly（dC）的大约 2.5 倍，是由于嘌呤碱基与 α-HL 的相互作用比嘧啶更强（Meller et al. 2000）。这些相互作用的强度（用 $t_P$ 表示）随着植入富含嘧啶的 DNA 中的嘌呤的数目的增加而增加，大致呈线性关系，直到嘌呤和嘧啶的比值接近约 50%（Meller and Branton 2002）。这个结果支持转位时间主要由 DNA 和通道的相互作用所决定的观点。

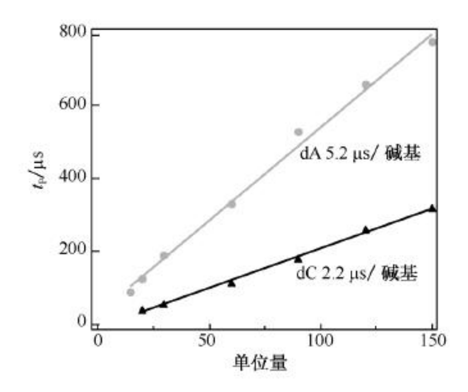



图 18-5　最可能的转位时间 $t_p$ 对腺苷酸（浅色）和胞嘧啶（深色）同质多聚体 ssDNA 的长度范围为 20～150 个碱基时的依赖关系，15℃测量。对于 ssDNA 长度小于 40 个碱基的 DNA 用高效液相色谱（HPLC）纯化，其他则用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）纯化。

一个有关 ssRNA 同质多聚体的转位研究证实 poly（A）和 poly（C）同质多聚体的 $I_P$ 值显著不同（6%）（Akeson et al. 1999）。可以利用这一点来区分溶液中不同的 RNA 分子，也可以用于识别呈现两种状态转位事件的异质多聚体 $A_{30}C_{70}G$（Butler et al. 2006）。

$t_p$ 和 $I_P$ 两个参数还对在纳米孔内的 DNA 的方向敏感。最近的实验证实 $I_B$ 的分布有两个峰是由于 DNA 进入 α-HL 通道时有两个方向，3′端或 5′端。3′端先进入时有更大的阻滞幅度，而 5′端先进入时则峰值较小（Mathe et al. 2005）。这个结果已经在独立的分子动力学模拟体系中得到重复，即 ssDNA 位于通道中时，$K^+$ 和 $Cl^-$ 流过 α-HL 通道的分子动力学模拟体系（见图 18-6，见图版）。分子动力学模拟实验同时也为这种不

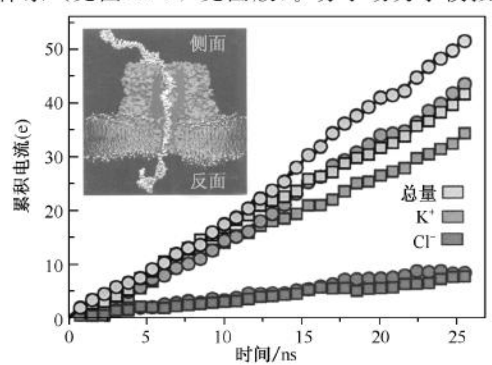



图 18-6　当 poly（dA）分子在纳米孔中时，$K^+$ 和 $Cl^-$ 转运通过 α-HL纳米孔的分子动态模拟结果。蓝色符号为 $Cl^-$ 对电流的贡献；橘黄色符号为 $K^+$ 对电流的贡献；灰色符号为总离子电流。做了两种情况的模拟：一个是 DNA 的 3′面向反式侧（方块），另一个是 DNA 的 5′面向反式侧（圆圈），两者的阻滞电流产生 20%的差异（线的斜率）。这个结果与实验非常一致（Mathé et al. 2005）。

对称性揭示了一个假设的机制：当 ssDNA 被局限在一个约为 1.5 nm 的孔中时，碱基发生了一个统一的向 5′端的倾斜。这种倾斜除了不对称的纳米孔结构之外，还通过阻止离子流（主要是 $K^+$）从一个方向到相反的方向而发挥调整阀门的作用。

DNA 最初局限于纳米孔中的无电压动力学也得到了研究。DNA 和 α-HL 的不对称的相互作用导致了有两个扩散时间（两者的扩散系数相差 1.7），这与 DNA 进入纳米孔时是 3′端先进入还是 5′端先进入有关（Mathe et al. 2005）。这些发现说明对于 DNA 和纳米孔的相互作用的单分子实验具有非常精细的灵敏度。

## DNA 和 RNA 的解链研究

由于 dsDNA 的直径过大不能进入 α-HL 1.5 nm 的茎中（见图 18-2）。因此，与 ssDNA 相比，平末端分子产生不同的电流阻滞信号。离子电流降低到孔开放电流的 50%左右，并且阻滞时间不依赖于 dsDNA 的长度。部分的电流阻滞的水平与 DNA 双螺旋（直径 2.2 nm）暂时嵌在纳米孔的入口处（直径 2.6 nm）有关（Vercoutere et al. 2001）。并且，磨损的末端（fraying end）或者末端的 DNA 错配会产生额外的电流阻滞，与中期阻滞水平非常接近。这种特征已经用于研究末端磨损（end-fraying）动力学以及它对 DNA 序列的依赖性（Winters-Hilt et al. 2003）。

纳米孔能用于直接把解链的力作用于 DNA 和 RNA 分子上。DNA 发夹或是带有单链突出的 DNA 杂交体与相似长度的 ssDNA 相比有更长的阻滞时间（Sauer-Budge et al. 2003；Mathe et al. 2004；Nakane et al. 2004）。特征性的阻滞时间随着双螺旋区域的碱基对的数目或发夹 G-C 含量呈指数性的增加。另外，特征性的阻滞时间指数性地（非常接近）依赖于所作用的电压约为 $e^{-V/V_\beta}$，在这里，$V_\beta$ 是一个特征性的电压（Mathe et al. 2004）。这些测量结果提示测量的阻滞时间等于（非常接近）发夹解链时间 $\tau_U$。此外，解链的转位或是发夹从纳米孔中出来的测量结果与上述不一致，因为这两个过程都不与所作用的电压或是发夹中的碱基数目产生指数的依赖关系。

另一个分析发夹解链的方法是纳米孔力光谱（NFS）。NFS 允许应用于时间依赖的电压变化：$V(t) = vt$，式中，斜率 $v$ 称为速率（Mathe et al. 2004）。这个方法与另一个单分子技术中的力光谱类似（Evans et al. 1995；Evans et al. 2001；Hugel and Seitz 2001）。NFS 的其中一个优点是它能在固定电压的方法达不到的和尤其是在低电压（力）的体系下进行测量（图 18-7）。Mathe 等（2005，2006）发现发夹的解链动力学可以用两种体系来识别：一是高力（高速率）体系，在这个体系中，发夹的解链本质上是一个不可逆的过程；二是低力（低速率）体系，在这个体系中在发夹被推出纳米孔之前可能发生好几次重新成链。对该现象的解释是基于一个称为单能量屏障交叉（single-energy barrier crossing）的简化模型。另外，最近发展了一个与其关系更密切的对该数据的理论解释（Dudko et al. 2007）。NFS 对发夹能量极度敏感，能够区别单个碱基的错配，能够检测未标记的核苷酸的单分子杂交，并且，由于大批的 DNA 在纳米孔中进行探测之前已经完成杂交，就避免了 DNA 杂交过程中的偏差表面效应。

## 用 NFS 研究 DNA-蛋白质的相互作用

NFS 已经用于研究力诱导的 DNA 与蛋白质复合物的解离，特别是外切核酸酶 I 与

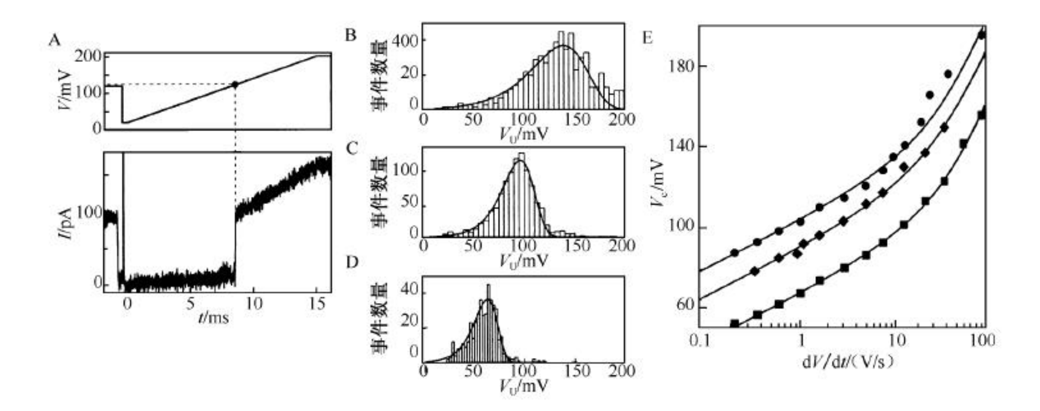



图 18-7　时间依赖的力作用于在纳米孔内的单个 DNA 发夹分子。A.（上图）用动态电压控制施加的电压曲线图（Bates et al. 2003；Mathe et al. 2004），触发带有一个（dA)$_{50}$突出端的 DNA 发夹进入 α-HL 通道。结果是发夹的解链大约需要 9 ms，见下图中电流的跳跃。电流的跳跃用于确定每个事件的解链电压 $V_U$。B～D. 在不同速率 $v$ 的条件下测量时，每个由 1000 个解链事件组成的 $V_U$ 的柱状图。10 bp 发夹，$v$ = 0.6 V/s。E. 10 bp（●）、9 bp（◆）、7 bp（■）发夹的临界解链电压 $v_c$（实线）用双态（two-state）模型拟合，包括独立的向前和向后的解链率（经允许复制自 Mathe et al. 2006）。

靶 ssDNA 的相互作用（Hornblower et al. 2007）。结合到蛋白质上的 ssDNA 不能通过纳米孔转位，导致长时间的离子电流阻滞，大约为孔开放电流的 10%（由于 ssDNA 堵塞）。利用 NFS，当 DNA 链脱离纳米孔到另一边时，电压诱导的复合物解离的信号可以用通过纳米孔的离子电流的突然增加来显示。每个断裂事件产生的断裂电压（$V_R$）和从大约 1000 个单分子事件所累积的分裂电压的分布用于确定最可能的分裂电压（$V_C$）。$V_C$ 对 $v$（绘成半对数刻度）的依赖关系可以用来测量复合物的结合和解离的比值。原则上这种方法是通用的，可以适用于其他的 DNA 和蛋白质的相互作用系统。

## 随机传感器

利用生物分子工程的方法，生物通道可以通过修饰来把更敏感的元件纳入到纳米孔中。例如，α-HL 通过工程修饰引入一个二价金属离子的结合位点，因此对每种离子显示出不同的电流阻滞模式，从而可以用于离子结合动力学的研究（Kasianowicz et al. 1999；Braha et al. 2000）。有机分析物，如 TNT（Guan et al. 2005）、1，4，5-三磷酸肌醇（Cheley et al. 2002）和其他（Gu et al. 1999；Braha et al. 2005）可以用工程改造的 α-HL 和（或）临时接头来检测。最近，手性药物的结合也在单分子水平得到随机的辨别。α-HL 通过工程改造把一个手性分子的接头结合到通道的反式面（β-环式糊精）（Kang et al. 2006）。把（*R*-）和（*S*-）布洛芬对映体随机结合到接头上产生不同的离子电流（图 18-8）。在同样的研究中，该方法能够在微摩尔水平检测撒利多胺（反应停）对映体的外消旋作用。

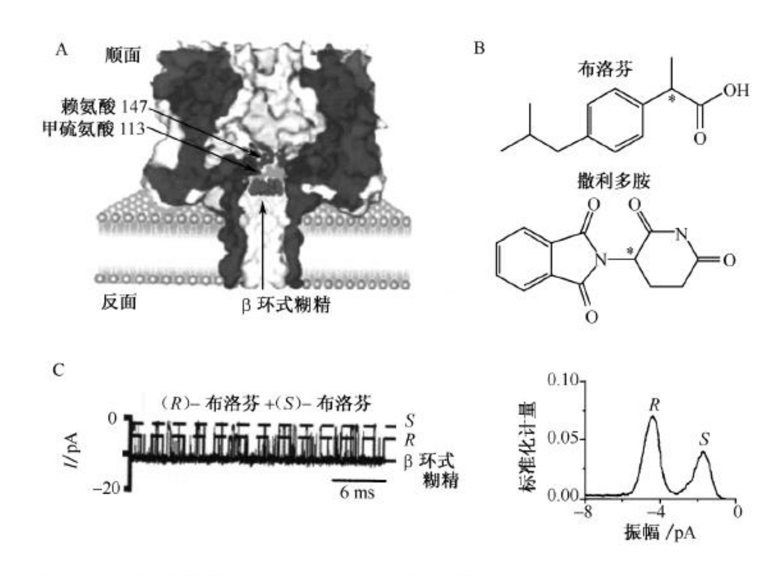



图 18-8 用遗传修饰的 α-HL 孔做的随机传感器。A. α-HL 孔的纵切面显示突变位点和 β 环式糊精（β-CD）接头的定位。B. 布洛芬和撒利多胺的结构。C. 电流的轨迹显示（*R*)-和（*S*)-布洛芬与 α-HL • β-CD 的相互作用。约 10 pA 的孔基础电流对应于 β-CD 在纳米孔内（从反式面）。(*R*)-和（*S*)-布洛芬引起不同的阻滞状态，如右图显示的全点柱状图。随机结合的动力学抽提自这些轨迹。(经允许复制自 Kang et al. 2006 [美国化学学会])

## 人工合成的纳米孔的实验研究

用植入脂质层的纳米孔的单分子研究为生物多聚体的结构和动力学提供了丰富的信息。然而，脂质双分子层的寿命有限，并且把单个蛋白质插入双分子层也是一种挑战，这些都令人感到沮丧，也进一步使基于双分子层的传感器整合到高效装置变得复杂化。另外，蛋白质通道在双分子层中的横向扩散干扰了其他检测系统，如光学检测系统（Hemmler et al. 2005)。相反地，在人造膜中的合成纳米孔提供了较好的化学和机械的稳定性，能让研究者更精确地控制纳米孔的大小。在过去的 10 年中，研究者们努力地用不同的材料和技术制造合成纳米孔。下文简短的概述了各种不同的合成纳米孔体系。

### 固态薄膜中的纳米孔

Li 等（2001）介绍了用离子束雕刻技术在固态硅表面上制造的纳米孔。在这项技术中，用氩离子的能量束喷射到含有一个碗状凹陷的氮化硅（$Si_3N_4$）膜表面。这种喷射使膜变薄，最终通过检测氩离子的泄漏来确定是否形成了一个纳米孔。用这种方法可以制造直径小到 1.5 nm 的纳米孔，孔径的大小由发射电镜（TEM）测定。Storm 等(2003，2005a）用一个更简单的方法来代替离子束技术，就是用商品化的 TEM 发出的聚焦电子束（e-beam)。用这种方法把 300 kV 的强电子束照射在直径 100 nm 的微制造的二氧化硅孔上，使二氧化硅液化而使孔收缩。直接用 TEM 制造纳米孔使得纳米孔的

制造和分析可以同时用 TEM 成像精确地（<1 nm）实时监测，如图 18-9 所示。也有报道用 TEM 在 $SiO_2$/ $Si_3N_4$ 膜上钻纳米孔（Keyser et al. 2005）。最近，用电子束制造高度均一的纳米孔或纳米孔阵列大大缩短了制造时间（Kim et al. 2006，2007）。聚焦的离子束也已经被用于在氧化/氮化膜表面制造纳米孔，这种技术制造的纳米孔可以通过定位沉淀（Nilsson et al. 2006）或用电子束液化的方法（Lo et al. 2006）使孔进一步缩小。

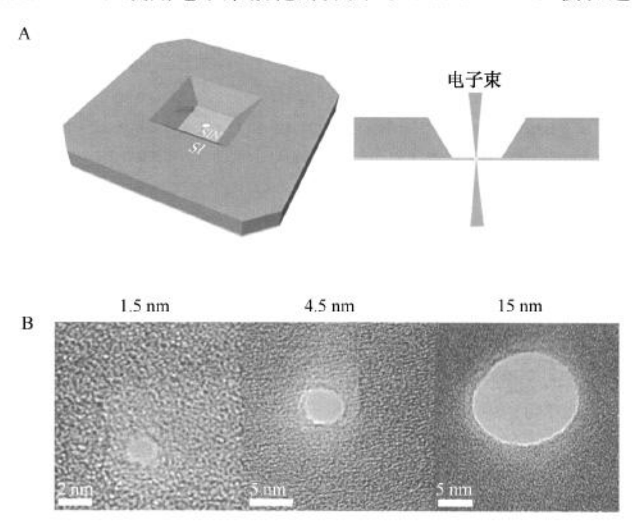



图 18-9　A. 由一束聚焦的电子束（用 TEM）在硅片支撑的超薄氮化硅窗上制造的固态纳米孔装置（未按比例）。B. 制造不同大小的纳米孔后氮化硅窗的 TEM 图像，如每个图像所示（Kim et al. 2006）。

生物大分子通过纳米孔的转位动力学强烈地依赖于生物大分子与纳米孔表面的相互作用。因此，很有必要精确地识别纳米孔的结构和纳米孔表面的性质。最近，Kim 和他的同事做了用电子束制造的固态纳米孔的三维断层扫描成像（Kin et al. 2006）。发现纳米孔为顶端截平的双锥形的结构，半角为（30±2）°，有效的纳米孔长度约为 $h/3$，式中，$h$ 为 $Si_3N_4$ 膜的厚度（见图 18-10 的插图）。一系列大小范围为 3～15 nm 的纳米孔（在最狭窄处测量）做好后安装到能检测通过纳米孔离子流的装置上。这些孔产生的欧姆 $I$-$V$ 曲线可以用于确定孔电导率 $G$。考虑到孔的表面形状，电导率可以用下面的公式来描述：

$$G=\frac{\pi d^2}{4}\sigma\left(\frac{\delta\tan\alpha+1}{h+h_{eff}\delta\tan\alpha}\right) \tag{1}$$

式中，$\sigma=(\mu_k+\mu_{Cl})\,n_{KCl}\,e$ 是指在一个数量密度 $n_{KCl}$ 下的特异电导率，当 KCl 浓度为 1.0 mol/L 和 0.2 mol/L 时分别等于 15.04 $(\Omega\cdot m)^{-1}$ 和 3.01 $(\Omega\cdot m)^{-1}$（$\mu_k$ 和 $\mu_{Cl}$ 分别为 $K^+$ 和 $Cl^-$ 的电泳迁移率，e 是基本电荷单位）；$\delta=(h-h_{eff}\cdot)/d$，式中 $h_{eff}\cdot$ 为纳米孔的圆柱状区域的宽度；$\alpha$ 为圆锥的半角。图 18-10 描述了 $G$ 对纳米孔直径的依赖性，纳米孔的直径由 TEM 成像来确定。图 18-10 中的实线与公式（1）相符合，考虑由 TEM 三维断层扫描所确定的孔的结构，加入了几何参数：$\alpha$ 和 $h_{eff}\cdot$。

已经有人通过分析 DNA 转位过程中盐对纳米孔电导率和电流的作用，研究了表面

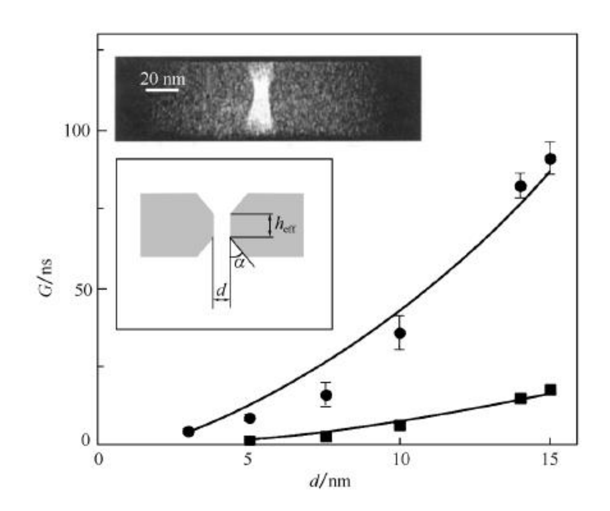



图 18-10　固态纳米孔的电导率和它们的直径的依赖关系（用 TEM 测量）。结果显示的条件为 1 mol/L（圆圈）和 2 mol/L（方块）KCl，pH 8.5 和 21℃。插图为 TEM 断层扫描显示纳米孔两头截平的圆锥结构，可以用公式（1）估算（见正文）(Kim et al. 2006)。这个公式用于拟合电导数据（主图中的实线）。

电荷效应（Ho et al. 2005；Smeets et al. 2006）。Smeets 等（2006）发现了直径为 10 nm $SiO_2$ 做的纳米孔，在低盐浓度的条件下（<0.1 mol/L），表面电荷决定了纳米孔的电导率，导致 $G$ 对盐浓度的非线性依赖关系（见图 18-11，见图版）。有趣的是，在低盐浓度时，DNA 转位导致的是瞬间电流增加而不是下降。电流的增加和 DNA 贡献电荷与阻滞电流有关，这种情况在高盐的条件下看不见。

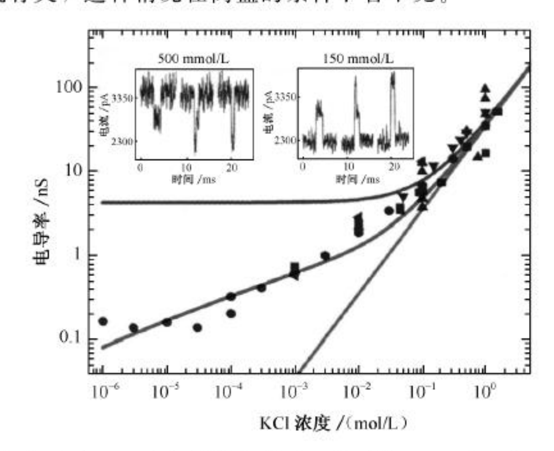



图 18-11　孔开放电流对 KCl 浓度的依赖关系，范围从 1 μmol/L 到 1 mol/L（Smeets et al. 2006)。不同的符号代表 10 个不同的纳米孔［直径为（10±2）nm］。绿线为一批计算的离子电流的理论计算值；蓝线为恒定的表面电荷模型；红线为变化的表面电荷模型。插图为 DNA 在两个盐浓度条件下通过 10.2 nm 孔的转位事件（如图所示），导致电流在降低盐浓度时从降低向增高转换。(经允许复制自 Smeets et al. 2006［美国化学学会］)

固态纳米孔已经被用于研究 ssDNA 和 dsDNA 的转位，有一些研究通过定量 PCR 的方法证实了转位过程（Li et al. 2003；Chang et al. 2004；Heng et al. 2004；Fologea et al. 2005a，b；Storm et al. 2005b；Kim et al. 2006）。显然 DNA 的转位速度受许多因素的影响且范围很大，如孔的结构、施加的电压、温度和溶液的黏滞度。在这些因素中，最关键的因素是孔的大小，因为孔的大小限制了 DNA 和孔壁的相互作用。有人用 8～10 nm 的纳米孔观察阻滞离子电流的多个状态，研究了折叠的 dsDNA 的转位（Li et al. 2003；Storm et al. 2005）。当纳米孔直径小于约 4.5 nm 时就观察不到折叠 DNA 的转位。在这个体系中，最近观察到了 DNA 以单个纵列（伸展开的）的方式发生转位（Kim et al. 2006）。

### 玻璃/石英纳米孔

用毛细管拉制成的纳米吸头已经作为随机传感器用于研究 DNA 的转位（Karhanek et al. 2005）。在这个系统中，用一个精密的拉制器把一根玻璃（石英）毛细管拉成很细的吸头，这是一种直接而又廉价的技术。平均口径可以用测量通过每个吸头的离子电流来估计。扫描电镜（scanning electron microscope，SEM）可以提供吸头嘴的形状信息，虽然它的分辨率不足以确定吸头口径。这项技术的主要缺点是吸头的口径不能在纳米水平得到精确地控制。然而，用这种方法获得了小口径的纳米孔（如 6 nm）（Shao and Mirkin1997）。White 和他的同事们通过把一根玻璃毛细管封接到一段非常尖的铂金丝上，然后在玻璃和铂金丝上蚀刻的方法制造了直径小到 15 nm 的纳米吸头电极（Zhang et al. 2004；Wang et al. 2006）。

### 多聚体膜纳米孔

用一项称之为轨迹-蚀刻法（track-etch）的技术（Fleischer et al. 1972），多聚体膜（如聚碳酸酯、聚酰亚胺和对苯二酸聚乙烯）能通过重核辐射后在膜上产生轨迹。利用一个挡板和敏感的离子检测器，可以控制离子流量只让单一离子通过膜。多聚体膜受辐射后在水浴中进行化学蚀刻直到有孔形成。将膜转移到另一侧的终止水浴槽来终止蚀刻。孔的大小通过测量溶液中通过孔的离子流来估计。通过控制孔的形状（如从锥形到圆柱形）（Harrell et al. 2006）、大小、化学功能性（如多聚体膜的选择、修饰），这些孔可以成为单分子检测 DNA（Schiedht et al. 2005）、蛋白质（Heins et al. 2005a）和其他大分子（Heins et al. 2005b）的多方面的平台。

### 电线板纳米孔

Crooks 和同事们用多层碳纳米管为模板制造了直径 100 nm 以下的纳米孔（Ito et al. 2003a，b）。在这个方法中，把环氧树脂多聚化在一个拉长的多层碳纳米管上，然后用薄片切片机把这个模子切割开。Saleh 和 Sohn（2003）用基于聚二甲基硅氧烷（PDMS）的微制造规则做了 300 nm 的通道用于感受 DNA 分子。Yang 和他的合作者制造了 GaN 纳米管，并用它们作为单个 DNA 分子阻力感受的通道（Goldberger et al. 2006）。如果用 ZnO 纳米线作为可蚀刻的内层模板，GaN 管径的大小就可以通过控制 ZnO 的厚度来控制（内径可以低到 30 nm）。

对于转位记录（见图 18-12A），有两种数据获取的方法。

• 连续记录：电流和电压连续地被保存在存储器里（通常直接到电脑的硬盘上）。

• 事件驱动的获取：电流和电压记录由每个事件驱动。一个事件定义为电流降低到预先设定的阈值后又增加到初始电流值的过程（Meller et al. 2001）。

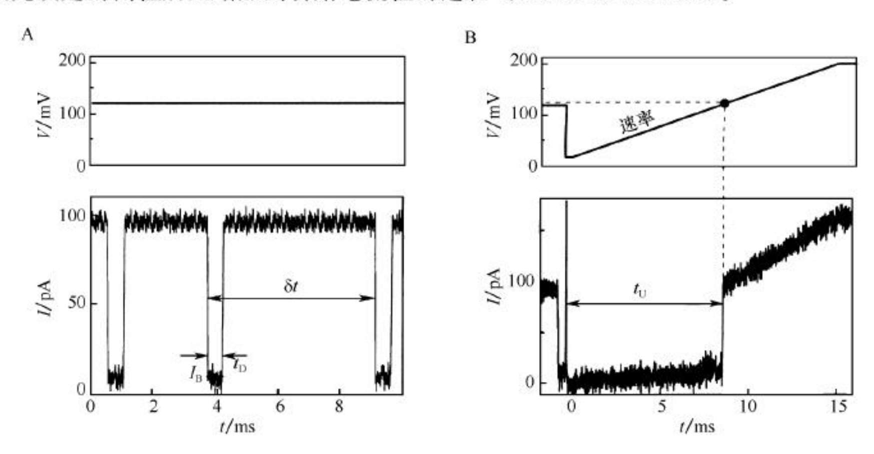



图 18-12　两种类型实验的比较。A. 在转位模式中，电压保持在一个恒定的值记录电流的变化，用持续记录（如图所示）或是事件驱动的模式记录（如图 18-4A）。B. NFS，带有突出端的双螺旋 DNA 首先锚定在纳米孔内，然后施加一个逐渐增加的电压（voltage ramp），引起 DNA 的解链（在 9 ms 时）。在 NFS，用一个模拟激发器激发每个事件的时间依赖的电压图谱。

在事件驱动的记录中，数据流到一个缓冲器中进行选取，然后缓冲器又被新的数据重新刷新。为了及时显示在两个相关的点上的孔开放电流，数据点在事件的前后立即被采集。在事件驱动的模式中，能够记录每个事件的绝对时间标记，从而评价在时间范围内的事件率。

在动态的电压控制模式中，膜电压（$V_M$）由计算机控制，把数据获取板（DAQ）的模拟输出线连接到膜片钳放大器的外部电压输入线（Bates et al. 2003）。离子电流用循环缓冲器连续采样。模拟触发器能够产生一个预先定义的电压图形。例如，一个跃阶、一个斜线或任何其他式样的变化。正如简介部分提到的一样，这种方法特别适合于研究 DNA 和 RNA 的解链（Mathe et al. 2004，2006），利用 NFS 研究 DNA-蛋白质的相互作用（Hornblower et al. 2007）以及 DNA 出纳米孔的无电压扩散（Mathe et al. 2005）。利用动态电压控制，有可能探测在低电压（低力），特别是在捕获 DNA 所需的电压阈值以下（α-HL 约为 50 mV；Meller et al. 2001）的生物大分子的相互作用。单分子实验的输出量主要由进入纳米孔的速率决定，速率又与施加电压成指数依赖关系（Meller and Branton 2002）。因为动态电压控制允许应用动态电压曲线，因此可以在不损失单分子的输出量和时间分辨率的情况下提供更大的分析适应性。

图 18-12B 显示了用 NFS 分析的一个典型的 DNA 发夹解链事件，电压设置为 120 mV（以允许高事件捕获率）。DNA 进入纳米孔时，信号显示为电流的陡然降低，电压降低到钳制状态（20mV），然后电压以预先定义的速率 $v$ 上升 $V(t) = V_H + vt$。发夹解链信号显示为电流在一定的时间 $t_U$ 内从阻滞状态突然跳跃到开放状态（图 18-12B）。电流的跳跃可以用来确定实验中每个分子相应的解链电压（图 18-12B 中的虚线）。要注意的是任何用 DAQ 突然地改变施加电压（如在图 18-12B 中 $t$ 接近 0）会引起膜片钳放大器的短暂饱和（见正电流峰）。通过调节膜片钳放大器的电容消除可以把峰的幅度降到最低，从而使停滞时间最小化。

## 建立高带宽低噪声的纳米孔装置

建立低噪声的纳米孔装置的基本原则是与已经建立的单通道记录技术相类似。更详细的实验细节，请参照 Hille（2001）与 Sakmanm 和 Neher（1995）的教科书。另一个很有用的资源是 *The axon guide*（Sherman-Gold 1993）。需要考虑的重要的一点是带宽的测量，定义为测量中使用的内部和外部的低通滤波器。虽然高带宽提供了更好的时间分辨率，但均数平方根（RMS）随着带宽的增加而迅速增加。因此，测量的优化依赖于发现最高的带宽来提供足够的信噪比。DNA 的转位和解链测量常常需要微秒级的分辨率。所以，常用的最大带宽为 50～100 kHz，因为更小的带宽或滤过设置会导致偏态分布从而很难解释。

为了使低频噪声最小化，装置必须正确接地，避免接地环路。多层屏蔽、温度和机械稳定性对于低噪声测量非常关键。高频噪声主要取决于细胞的电容以及前级（head-stage）/放大器的结合使用（表 18-1 为两种前级/放大器结合使用的比较）。在脂质双分子层的实验中，用小孔径（10～20 μm）可以减少细胞电容。图 18-13 显示了一种低噪声的设计装置，这种装置利用热电的温度控制，它可以用于高带宽的测量，其中噪声很大程度上来源于纳米孔/膜系统本身。在这个设计中，温度可以在 0～65 ℃调节，并且精确度大于 0.1℃。以下是这个系统的主要组成部分。

- 一个聚四氟乙烯（PTFE，如特富龙）纳米孔装置。
- 一对 Ag/AgCl 电极。

**表 18-1　在一个典型的纳米孔装置中比较两种高效膜片钳放大器结合使用前级的方法测量的均数平方根（RMS）噪声值（pA）**

| 带宽/kHz | Axopatch 200B/$_{RMS}$/pA | | HEKA EPC-8/$_{RMS}$/pA | |
|---|---|---|---|---|
| | 屏蔽前级 | α-HL 细胞 | 屏蔽前级 | α-HL 细胞 |
| 5(内米) | 0.46 | 0.64 | 0.53 | 0.70 |
| 5[a] | 1.1 | 0.95 | 1.1 | 1.25 |
| 10[a] | 1.3 | 1.5 | 1.6 | 2.2 |
| 30[a] | — | — | 4.7 | 9.7 |
| 100[b] | 7.0 | 10.0 | 18.0 | 45 |

外部测量用 Tektronix TDS3052B(500 MHz)数字示波镜检测。

[a]用倍率为 10 mV/pA 和内部八阶巴赛尔滤波器来测量。

[b]100 kHz 的带宽没有被过滤。

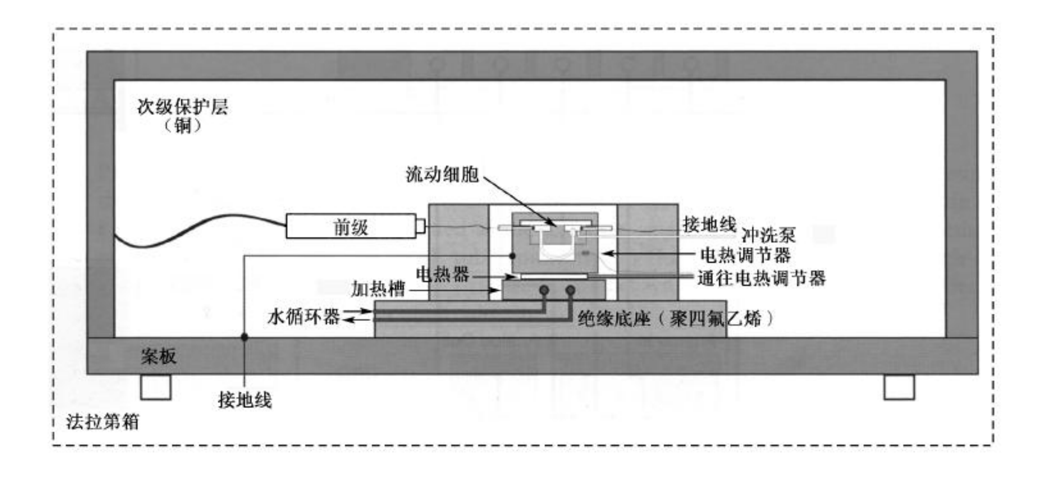



图 18-13 优化的纳米孔装置用于高带宽低噪声离子电流测量的示意图。这个设计在标准的法拉第箱内安装了双层的电磁（EM）屏蔽并且用热电元件进行温度调节。测量装置（见图 18-15）由 PTFE（特富龙）作成。这个测量装置可以在两次测量之间拆卸并且可以完全的清洗。这个装置可以固定在一个相匹配的固定器上（镀金的黄铜），用于热绝缘（PTFE）围绕的热化和 EM 屏蔽。这个设备和前级放在一个带伸缩盖的次级屏蔽箱（铜和铝作成）内。

- 缓冲液流入/流出管。
- 一个由镀金的黄铜制成的温度可调的支架（用于控制温度和电屏蔽）。
- 一个绝缘的 PTFE 底座。

这个装置放置在次级的由 2 mm 厚的粗铜片作成的金属屏蔽箱内（大约鞋盒大小）。次级屏蔽箱的开放和关闭应该用接地的不锈滑动杆在顶端平稳的滑动。次级屏蔽箱对于减少低频噪声极其有效。这个箱子通过绝缘腿安放在振动隔离台上，然后装入一个商品化的法拉第箱。前级放在次级屏蔽箱内与细胞非常接近。热电温度控制器产生的热量通过低速循环水浴带走（因而避免电扇常常产生的机械噪声或电噪声）。

图 18-14 显示了一个典型的膜片钳放大器（本例中用的是 Molecular Device 公司的 An Axon 200B）通过一个低通滤波器（四阶巴特沃斯滤波器）连线到 DAQ 界面面板。这个示意图显示了模拟输出连接到放大器的外部需求输入，后者为动态电压控制所需。液晶（LCD）显示屏比阴极射线管（CRT）显示屏更好一些，因为后者会引入电磁噪声辐射。表 18-1 比较了在空前级和典型的 α-HL 细胞设置情况下两种不同带宽常用的膜片钳放大器的噪声值。

以下的实验方案包括目前在脂质双分子层中组装 α-HL 蛋白通道的方法、合成纳米孔装置的组装方法以及固态纳米孔的制造方法，我们主要关注用于单分子研究的纳米孔的特征，然后叙述一些可以用纳米孔所做的实验。

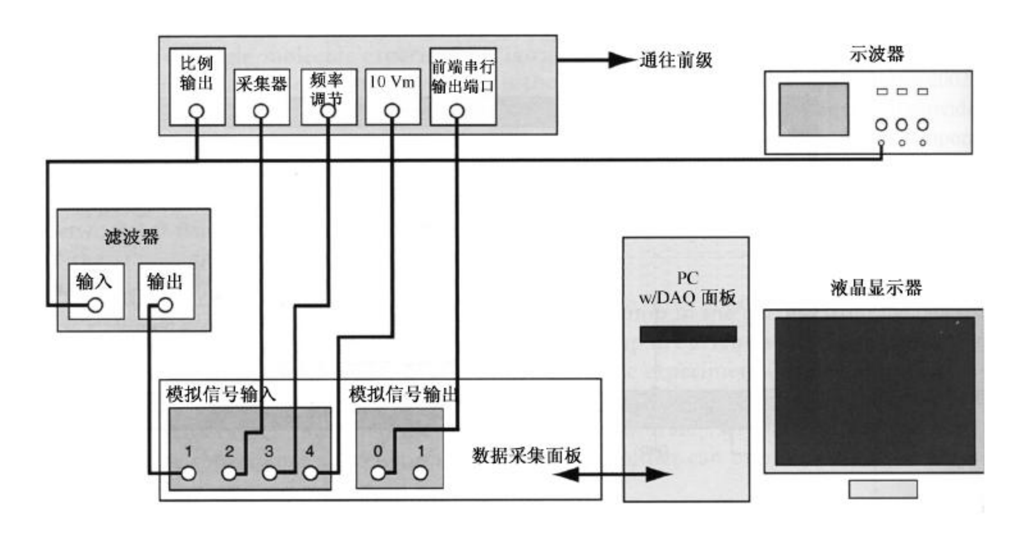



图 18-14　在纳米孔实验中用于电流测量所需的基本组件的电路示意图。在图中，通过把 DAQ 板的模拟电压输出连接到放大器的外部指令使动态的电压控制成为可能。

## 实验方案 1：α-血溶素在脂质双分子层中的体外自我装配

蛋白质孔，如 α-HL，能在已形成一个小孔（直径 20～40 μm）的磷脂双分子膜中进行体外自我装配。这个孔可以在 PTFE 薄膜上制造，也可以用下面的方法做在一段 U 形 PTFE 小管的末端。PTFE 管连接了两个充满高离子浓度的缓冲液（通常是 1 mol/L KCl）的腔室，缓冲液与一对 Ag/AgCl 电极相接触。这个装置可以用于单分子实验。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

**要点**：整个实验方案中使用的 $H_2O$ 在使用之前都要用 Anotop 0.02 μm 的滤膜（Whatman）过滤。

#### 试剂

金黄色葡萄球菌的 α-血溶素（250 μg；Calbiochem）<!>

1，2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine（25 mg；Avanti Polar Lipids）<!>

把脂分装到 6 mm 试管中，350 μg/管，−20℃保存。

乙醇

乙醇在使用之前用 Anotop 0.02 μm 的滤膜（Whatman）过滤。

十六烯（Hexadecene）<!>

己烷（光谱级）<!>

KCl（1 mol/L；用 10 mmol/L Tris 调 pH 至 8.5，排气，用 0.02 μm 的滤膜过滤）

脂预处理溶液

把一管 diphytanoyl phosphocholine <!>溶于 100 μl 的光谱级的十六烯<!> 中。

脂溶液

把一管 diphytanoyl phosphocholine <!>溶于 15 μl 的十六烯<!> 中。

硝酸（20%液体 $HNO_3$）<!>

#### 装置

Ag/AgCl 电极（一对，屏蔽的；Molecular Devices 公司）

模拟低通滤波装置（Krohn Hite）

数据获取板及界面（NI PCI-MIO 16E [12 bit] 或 PCI-625 [16 bit]；National Instruments）

加胶用的微量进样器枪头（200 μl）

煮沸酸用的电炉板和水浴

微量进样器

干燥用 $N_2$（气体）

用于植入膜的蛋白质的纳米孔装置以及固定器（自制）（如图 18-15）

示波镜（数字；Tektronix）

膜片钳放大器（Axopatch 200B［Molecular Devices 公司］或 EPC 10［HEKA Instruments Inc.］）

带摇摆臂的立体镜（放大约 50 倍）

注射器泵（Harvard Apparatus）

热电温度控制器装置（Newport 3040，Newport 公司）

绵纸

带法拉第箱的振动隔离台（TMC II 型法拉第箱）

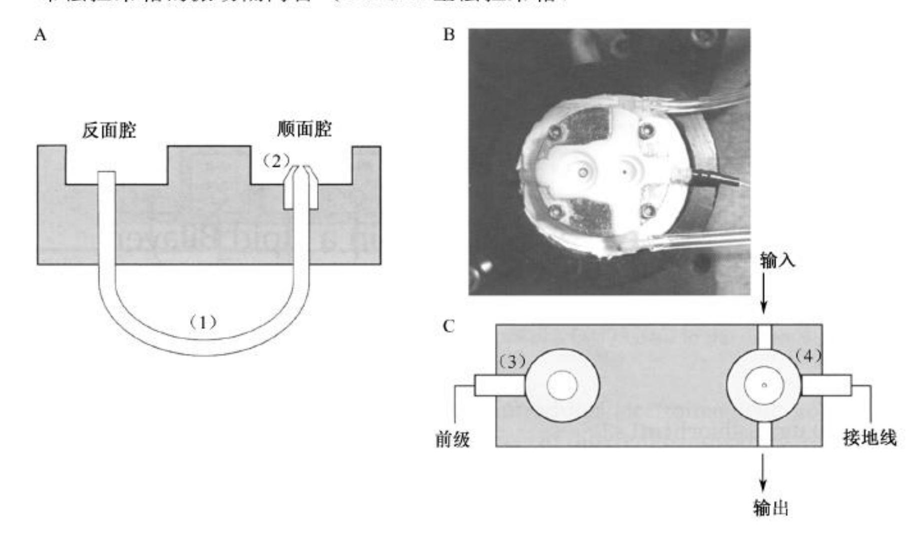



图 18-15 用于植入膜的 α-HL 通道记录的 PTFE 装置。A. PTFE U 形管（1）（连接反面腔和顺面腔）的侧面图。在 U 形管的末端有一个直径约 20 μm 的 PTFE 孔（2）作为双分子层的支持物。B. PTFE 装置的俯视照片；C. 装置的俯视图，显示在顺面腔上的小孔，缓冲液流入和流出的接口以及在反面腔（3）和顺面腔（4）上的电极接口。

## 方法

以图 18-15 为指导完成此实验方案。

1. 在化学通风橱中，用注射器把 20%液体 $HNO_3$ 注入纳米孔装置的 U 形管中。小心地把这个装置浸入到装有 20%液体 $HNO_3$ 的烧杯中。
2. 溶液煮沸 15 min。
3. 取出装置用 $H_2O$ 漂洗，把装置在 $H_2O$ 中煮沸 20 min。
4. 从电炉板上拿下烧杯，用 $H_2O$ 漂洗后在纸上轻拍干燥。
5. 把装置放在固定器上。将顺面腔充满乙醇，然后把抽真空的线连到 U 形管反面末端。用约 200 μl 乙醇冲洗整个管道。
6. 用光谱级的十六烯重复步骤 5。

7. 用真空泵干燥 U 形管 1 min。用干燥用 $N_2$ 流完全干燥装置。
8. 把装置放在测量仪器上，如图 18-15 所示连接电极。
9. 用微量进样器把 15 μl 的脂预处理溶液加到小孔上。用一个充满空气的注射器从顺面端轻轻的推入空气进行干燥。在进行下一步操作之前将脂预处理溶液在空气中干燥 10～15 min。
10. 将顺面和反面腔充满 1 mol/L KCl 缓冲液。用注射器缓慢地把 KCl 缓冲液注入 U 形管（避免在注射器或 U 形管中产生气泡）。
11. 打开膜片钳放大器，检验可获得短路。如果不能，检查在电极附近或 U 形管中是否有气泡而阻断电流。如有必要，重复步骤 10。
12. 用一个 200 μl 加胶吸头把脂质膜溶液加在小孔上。
    i. 把 200 μl 的加胶吸头浸入脂质膜溶液中。
    ii. 把大部分的溶液推到纸上。
    iii. 用立体镜定位双层孔在顺面腔中的位置。用加样器推空气的方法在小孔上形成脂溶液的小泡。

    **注意**：吸头不要碰到小孔，因为这样可能损伤小孔从而破坏脂质的预处理。

    iv. 产生的气泡应该会在小孔上形成双层，形成的双层可以通过观察电流突然降到零来检验。
13. 记录膜电容。

    电容是检查膜质量非常好的指示剂。一个覆盖整个小孔的双层将会产生最高的电流（约 10 pF，虽然实际的电流还将取决于孔的大小）。
14. 如果双层已经形成，用一个短暂的 300 mV 的脉冲使膜破裂（zapping）；这样会导致电流超载。用一个干净的吸头重新形成膜，如步骤 12 iii。

    当施加电压为 100 mV 时，dc 电流＜0.2 pA，说明密封良好。在 5 kHz 的带宽时 RMS 噪声应该＜0.5 pA（见排疑解难）。
15. 加 2 μl 的 α-HL 溶液（0.5 g/L）到顺面腔中，轻轻混匀，施加一个 100 mV 的正电压。

    单个的 α-HL 的插入应该在 30 min 内自发产生，显示的信号为室温时电流突然增加到 100 pA。

    如果形成好几个纳米孔，电流将增加到 100 pA 的倍数。为了获得单个的纳米孔，“zap” 双层膜，再重新操作，等待 α-HL 的重新结合。
16. 一旦检测到单个 α-HL 纳米孔形成后，立即打开注射器泵用 1 ml 的缓冲液冲洗顺面腔。
17. 关闭电压，调节 “pipette offset” 使电流无效。屏蔽装置，记录 *I-V* 曲线。依 *I-V* 曲线和图 18-3 所显示的进行比较。

    这时候装置可以用于 SM 测量。
18. 非常小心地加入要分析的样品，避免破坏膜。加入分析样品后，重新屏蔽装置，等待温度稳定。继续分析。

**问题**：膜不能重新形成。

［**步骤 14**］

**解决方法**：PTFE 孔上的脂预处理可能不充分。重新小心清洗 PTFE 装置，从步骤 1 开始。

## 实验方案 2：用固态纳米孔建立单分子实验

有关在 $Si_3N_4/SiO_2$ 薄膜上用 TEM 制造固态纳米孔的方法已经在文献上有所描述（storm et al. 2003，2005a；Kim et al. 2006）。制造纳米孔需要创造条件来诱导材料在局部的区域熔化/蒸发。这个条件可以通过一强电子束聚焦在几纳米的窗口区域，导致局部区域逐渐变薄最终形成纳米孔。一旦形成纳米孔后，纳米孔的大小可以通过调节电子束的强度使孔进一步变大或收缩。最后，纳米孔的大小可以通过 TEM 成像来确定，并且做进一步的调整来达到所期望的大小。用这种方法制造的纳米孔比其他技术制造的更好一些，因为这种技术能够获得图像的反馈从而能直接高分辨（约 0.5 nm）地控制纳米孔的大小。制造薄的窗口区域涉及许多照相平版印刷的微制造步骤。

1. 在 500 μm 厚的硅晶片的一面低压化学汽相沉积（LPCVD）一层低应力的 $Si_3N_4$ 膜（厚 20 nm 或 50 nm）。
2. 用遮盖物和抗蚀剂确定窗口的大小（50 μm×50 μm）。
3. 化学湿式蚀刻暴露的硅窗口。通常，窗口越小机械稳定性就越好，因此破裂的机会就少。

为了进行固态纳米孔的单通道记录，芯片必须发挥在两种溶液之间隔离膜的功能，这样才能使纳米孔成为两种溶液之间唯一的连接。这里就引发了一个技术点，即区分固态纳米孔和生物孔。生物孔是通过在水溶液中组装而整合到双层膜中的，因此在形成的通道中充满了 $H_2O$。此外，固态孔是在真空条件下制造的，因而接下来的湿润就成为问题，特别是对于在分子大小范围的纳米孔（1～10 nm）。通常未处理的氧化硅和氮化硅表面由于从空气中吸收了有机的和无极性的物质，因而是疏水的。这些疏水表面很难被湿润，因为气泡在疏水孔中很稳定。气泡和其他的污染物也会引入电流的波动，因此应该避免这种情况。为了把水性环境引入纳米孔中，需要有一个干净的、亲水的表面。通过正确的重复清洁和组装可达到这个要求，下文概述了这种方法（见图 18-16）。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

**要点**：整个实验方案中使用的 $H_2O$ 在使用之前都要用 Anotop 0.02 μm 的滤膜（Whatman）过滤。

#### 试剂

乙醇

乙醇在使用之前用 Anotop 0.02 μm 的滤膜（Whatman）过滤

十六烯（Hexadecene）<!>

$H_2SO_4$（浓）<!>

过氧化氢（$H_2O_2$）<!>

KCl（1 mol/L；用 10 mmol/L Tris 调 pH 至 8.5，排气，用 0.02 μm 的滤膜过滤）<!>

Kwik-Cast 黏合剂（World Precision Instruments）

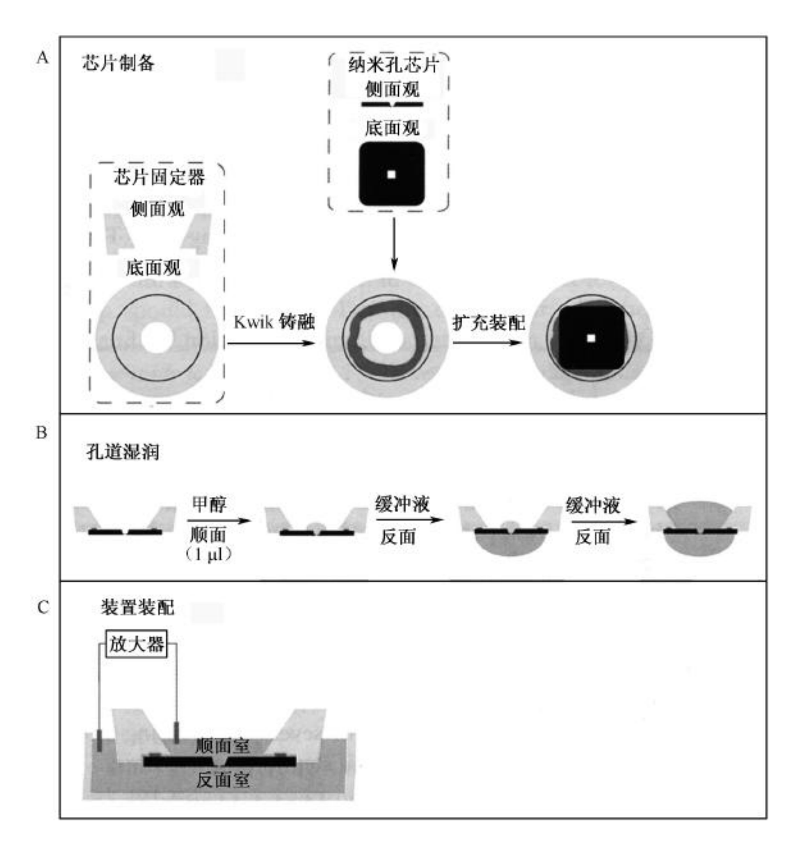



图 18-16 放置固态纳米孔的 PTFE 装置。A. 把纳米孔芯片封接到芯片固定器的示意图；B. 湿润纳米孔的步骤，用甲醇作为湿润剂，然后用 KCl 缓冲液冲洗芯片的两侧；C. 组装好的纳米孔装置的侧试图。

甲醇<!>

硝酸（20%液体 $HNO_3$）<!>

## 设备

Ag/AgCl 电极（一对，屏蔽的；Molecular Devices 公司）

模拟低通滤波装置（Krohn Hite）

数据获取板及界面（NI PCI-MIO 16E [12 bit] 或 PCI-625 [16 bit]；National Instruments）

直流电源

Erlenmeyer 烧瓶或烧杯

电炉板设到 100℃

干燥用 $N_2$（气体）<!>

用于固态纳米孔的纳米孔装置以及固定器（自制）（如图 18-16）

示波镜（数字；Tektronix）

巴斯德吸管

膜片钳放大器（Axopatch 200B［Molecular Devices 公司］或 EPC 10［HEKA Instruments Inc.］）

$Si_3N_4$ 或 $SiO_2$ 膜［芯片 3 mm×3 mm 或 5 mm×5 mm，膜厚度 20～50 nm（和所期望的一样），膜窗口大小 50 μm×50 μm（如图 18-9）］

带摇摆臂的立体镜（放大约 50 倍）

试管（10 mm×75 mm）

热电温度控制器装置（Newport 3040，Newport 公司）

镊子（尖头的）

带法拉第箱的振动隔离台（TMC II 型法拉第箱）

## 方法

1. 把芯片放于洁净干燥的 10 mm×75 mm 试管中，把试管放于 Erlenmeyer 烧瓶或烧杯里。
2. 在化学通风橱里，用巴斯德管吸 1 ml $H_2O_2$ 到试管中，然后加入 3 ml 浓 $H_2SO_4$。当用新鲜的过氧化氢溶液时，混合物（称为 piranha 溶液<!>）会沸腾。用吸管小心搅拌溶液，但要避免和芯片接触。把烧瓶或烧杯放在设置到 100℃的电炉板上加热 10～15 min。

   **注意**：*piranha 溶液会和有机材料剧烈反应，操作时要非常小心，根据地方法规处理废弃物！*
3. 从电炉板上拿下烧杯。用吸管从试管中吸出大部分的 piranha 溶液。
4. 在试管中注满 $H_2O$。用试管搅拌几次，然后吸出大部分的 $H_2O$，重新加入新鲜的 $H_2O$。重复这个步骤 4 或 5 次。
5. 从试管中吸出大部分的 $H_2O$，加入乙醇。完全混匀。
6. 除去乙醇，倒转试管使芯片接近试管的开口处，用干净的尖头镊子夹住芯片边缘。
7. 在芯片边缘抽吸干燥芯片。把干燥的芯片放在一个干净平整的表面，有膜的一边朝上。
8. 用沸腾的 piranha 溶液或是用 20%$HNO_3$ 煮沸 20 min 用于清洁纳米孔装置和芯片固定器，然后用大量的 $H_2O$ 冲洗后用 $N_2$ 干燥。
9. 把芯片固定器放置在一个洁净的表面，在固定器的底部涂上 Kwik-Cast 黏合剂，如图 18-16 所示。
10. 用镊子把芯片放在 Kwik-Cast 黏合剂上，覆盖 15 min 使 Kwik-Cast 黏合剂完成固化。
11. 固化后立即弄湿芯片避免任何灰尘积聚在芯片上。为了湿润芯片，加 2 μl 甲醇于芯片的顺式面，20 s，然后加 20 μl 缓冲液到反式面。
12. 加 1 mol/L KCl 缓冲液（约 100 ml）于顺式面，用吸管搅拌。去除缓冲液，用 KCl 溶液清洗芯片 3 次（确保完全去除甲醇）。

13. 在纳米孔装置中充满 KCl 溶液，把芯片固定器放在装置内，将两个 Ag/AgCl 电极连接到两个腔中。
14. 将电极的另一头连到膜片钳放大器，加 200 mV 电压，用示波镜观察电流。如果电流有波动或低于所期望的数值（参照图 18-10 的期望电导值），把电极从放大器断开。把电极连接到直流电源上，加 1 秒钟 2～5 V 的几个脉冲，然后把电极重新接回到放大器。
    这个操作帮助清除气泡和其他微弱结合的阻塞物。
15. 记录 *I-V* 曲线，通过手工设定电压或缓慢上升电压来监控电流。
    一般来说，固态纳米孔的 *I-V* 曲线应该是线性的，因为用 TEM 方法制造的纳米孔倾向于对称的结构。*I-V* 曲线强烈的非线性通常指示纳米孔被污染了，这样可能会导致孔开放电流的不稳定。
16. 拆除装置，取出芯片固定器，先用 $H_2O$ 完全清洗装置，然后用乙醇清洗并用 $N_2$ 干燥。
17. 把芯片的膜面浸泡在十六烯中，等 Kwik-Cast 黏合剂泡涨后芯片就能从固定器上分离。在空气中干燥芯片，然后用 piranha 溶液清洁芯片、纳米孔装置以及装置固定器，如步骤 1～步骤 8。
    现在芯片又可以重新使用。重新组装的芯片 *I-V* 曲线应该在 5%范围内重叠。

## 技术进展和未来展望

### 纳米孔和其他单分子技术结合

生物分子的纳米孔分析可以和许多其他的单分子方法相结合来提供生物分子动态学的互补信息。我们在这里讨论纳米孔系统怎么样和单分子荧光共振能量转移（SM-FRET）或光学钳相结合来加强我们对生物分子结构和功能的理解（见第 2 章和第 14 章）。

NFS 用于研究 DNA 和 RNA 分子的去折叠动态学以及 DNA 和蛋白质的相互作用（见前文“用 NFS 研究 DNA-蛋白质的相互作用”相关内容）。这个方法能高通量地研究单分子，因为生物分子不需要结合到力探针上，而对于原子力显微镜（AFM）悬臂或是光学钳（OT）的珠子是必需的。

一般来说，对于 AFM 和 OT，力是均匀地施加在整个生物分子上。长的折叠的生物多聚体，如 RNA 或蛋白质，包含许多结构域（如多发夹环），能够在施加力的作用下解折叠，但是伸展全貌（extension profile）所包含的波峰和波谷不一定按照分子的一级结构排列。相反地，当一个长的多聚体穿过一个纳米孔时，所施加的力按顺序地沿着生物多聚体的主干作用于每个结构域。因此，对于研究复杂的生物分子，纳米孔的解折叠过程能获得更多信息，至少从这个观点的理论角度看是这样（Gerland et al. 2004; Bundschuh and Gerland 2005, 2006）。但是，NFS 既不能提供分子在转位过程中与纳米孔协调工作的空间信息也不能提供分子从纳米孔中排出后的时间信息。这些不足之处可以用纳米孔-FRET 和纳米孔-OT 来解决。

Viasnoff 和同事们开发了一种用 SM-FRET 技术检测在 α-HL 孔中的分子的系统

(Lee and Meller 2007)。在他们的实验中，在分子内部标上一对 FRET 标签，因此折叠和非折叠的发夹状态分别产生高和低的 FRET 效率。然后用 NFS 解折叠分子，重折叠的动力学可以通过监测高 FRET 状态的恢复来检测。然后孔的电流信号可用来提供折叠过程开始时的时间印记。

最近，Keyser 等（2006b）发展了一种纳米孔-OT 系统，在这个系统中，DNA 包被的聚苯乙烯珠子保持在（非常接近）一个 10 nm 的孔附近。当 DNA 进入孔时，随着施加在珠子上的力的变化，可以观察到通过孔的离子电导的变化。通过改变施加的电压，可以测量施加在珠子上的力的变化，以测量在纳米孔内的 DNA 的“有效”电荷。最近已经发表了有关这个装置的详细描述（Kerser et al. 2006a）。

## 未来的展望

现在在光学上的进展使科学家能够以前所未有的时间和空间分辨率检测和操纵单个的生物分子，提供了对核酸、蛋白质以及亚细胞器的深刻的信息。纳米孔技术是一个新兴的单分子技术，这个技术最初是用于在单分子水平无探针的检测核酸。就在最近，它被用于进行生物分子操纵以及应用于研究核酸和蛋白质动力学。纳米孔检测纯粹是电子的。把力施加于带电荷的分子，通过探测经过孔的离子电流就有可能进行检测。在纳米材料研究领域的进展大大刺激了纳米孔的研究，生物分子的纳米孔分析成为一个快速发展的领域。在许多潜在的纳米孔应用中，我们介绍其中的几个。

- 纳米孔方法高通量的特性促进了几种 SM-DNA 测序方法的发展。例如，在其中一种方法中，研究者寻求建立这样一种纳米孔装置，它能把电子隧道测量技术与在纳米孔中的串行的 DNA 分子整合在一起。另一种方法是，当 DNA 穿过一个 2 nm 的孔时，有序地去除和读出标在 DNA 上的荧光探针（Lee and Meller 2007）。尽管在读出机制上有差异，但这两种策略都基于这样一种预测，即长的生物多聚体能够通过电泳穿过纳米孔，该孔基本上能把该生物分子限制在一维轨迹上。

- NFS 能用于在单分子水平研究 RNA 的去折叠和重折叠。纳米孔方法与 OT 或 NFS 有区别的其中一个方面就是去折叠的力是沿着多聚体的主干有序地施加的，整个分子的受力是不均匀的。相似地，分子的各个部分是从纳米孔有序地排出的，它们开始重折叠，这一点使纳米孔非常适合于研究 RNA 的共转录折叠，在共转录折叠中，生物多聚体的折叠发生在它自己合成过程中。

- 直径为 7～10 nm 的纳米孔能用于分析非常长的 dsDNA 分子以及和结合蛋白的相互作用。这些研究对于基因组范围内分析转录因子、抑制因子、增强子和其他 DNA 结合蛋白将会很有用。

- 无机的固态纳米孔的表面特性最近有人用单层的有机分子来修饰（Wanunu and Meller 2007）。这样就能允许我们调整固态纳米孔的敏感性和选择性，用于各种有机和无机分析物。固态支持物在机械上非常结实，能让研究者小心地控制孔的大小。这些特性能让科学家把随机感受器方法延伸到更大的生物复合物的研究。

随着合成材料和精密的制造工具的发展，能制备和识别更好的纳米孔，并且拓宽它们在生物感受器上的应用。另外，纳米孔检测和其他单分子技术的有力联姻，特别是 SM-FRET 和 OT，将在生物物理学和生物学领域开阔新的视野。

## 致谢

我们感谢过去和现在在波士顿大学 Meller 研究组和在哈佛大学 Rowland 研究所的成员，感谢他们帮助发展在本章中提到的方法和实验方案。我们还要感谢来自 M. Akeson, A. Aksimentiev, H. Bayley, C. Cantor, D. Branton, M. Burns, D. Deamer, C. Dekker, N. Dekker, E. Evans, A. Grosberg, U. Keyser, Y. Klafter, A. Kolomeisky, S. Ling, A. Marziali, D. Nelson, Y. Rabin, B. Schiedt, K. Schulten 和 B. Shklovskii 的有激励作用的谈话和投入。最后还要感谢美国国家科学基金会研究项目 NIRT-0403891 和 PHY-0417067，美国国立卫生院项目 GM-072893 和 HG-003574 以及人类前沿科学计划 RGP 36/2005 的支持。

## 参考文献


Akeson M., Branton D., Kasianowicz J., Brandin E., and Deamer D. 1999. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys. J.* **77:** 3227–3233.

Aksimentiev A. and Schulten K. 2005. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys. J.* **88:** 3745–3761.

Bantel H., Sinha B., Domschke W., Peters G., Schulze-Osthoff K., and Jänicke R.U. 2001. α-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J. Cell Biol.* **155:** 637–647.

Bates M., Burns M., and Meller A. 2003. Dynamics of single DNA molecules actively controlled inside a membrane channel. *Biophys. J.* **84:** 2366–2372.

Bezrukov S.M., Vodyanoy I., and Parsegian V.A. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature* **370:** 279–281.

Bhakdi S. and Tranum-Jensen J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **55:** 733–751.

Braha O., Webb J., Gu L.Q., Kim K., and Bayley H. 2005. Carriers versus adapters in stochastic sensing. *ChemPhysChem.* **6:** 889–892.

Braha O., Gu L.Q., Zhou L., Lu X., Cheley S., and Bayley H. 2000. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nat. Biotechnol.* **18:** 1005–1007.

Bundschuh R. and Gerland U. 2005. Coupled dynamics of RNA folding and nanopore translocation. *Phys. Rev. Lett.* **95:** 208104.

———. 2006. Dynamics of intramolecular recognition: Base-pairing in DNA/RNA near and far from equilibrium. *Eur. Phys. J. E* **19:** 319–329.

Butler T.Z., Gundlach J.H., and Troll M.A. 2006. Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore. *Biophys. J.* **90:** 190–199.

Cantor R.C. and Schimmel P.R. 1980. *Biophysical chemistry*. W.H. Freeman, New York.

Chang H., Kosari F., Andreadakis G., Alam M.A., Vasmatzis G., and Bashir R. 2004. DNA mediated fluctuations in ionic current through silicon oxide nano-channels. *Nano Lett.* **4:** 1551–1556.

Cheley S., Gu L.Q., and Bayley H. 2002. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. *Chem. Biol.* **9:** 829–838.

Coulter W.H. 1953. Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. Patent # 2,656,508.

Deamer D.W. and Akeson M. 2000. Nanopores and nucleic acids: Prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* **18:** 147–150.

DeBlois R.W. and Bean C.P. 1970. Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique. *Rev. Sci. Instrum.* **41:** 909–915.

Dudko O., Szabo A., Mathé J., Meller A., and Hummer G. 2007. Extracting kinetics from single-molecule force spectroscopy: Nanopore unzipping of DNA hairpins. *Biophys. J.* **92:** 4188–4195.

Evans E. 2001. Probing the relation between force-lifetime and chemistry in single molecule bonds. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30:** 105–128.

Evans E., Ritchie K., and Merkel R. 1995. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys. J.* **68:** 2580–2587.

Fleischer R.L., Alter H.W., Walker R.M., Furman S.C., and Price P.B. 1972. Particle track etching. *Science* **178:** 255–263.

Fologea D., Uplinger J., Thomas B., McNabb D.S., and Li J.L. 2005a. Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore. *Nano Lett.* **5:** 1734–1737.

Fologea D., Gershow M., Ledden B., McNabb D.S., Golovchenko J.A., and Li J.L. 2005b. Detecting single stranded DNA with a solid state nanopore. *Nano Lett.* **5:** 1905–1909.

Gerland U., Bundschuh R., and Hwa T. 2004. Translocation of structured polynucleotides through nanopores. *Phys. Biol.* **1:** 19–26.

Goldberger J., Fan R., and Yang P.D. 2006. Inorganic nanotubes: A novel platform for nanofluidics. *Acc. Chem. Res.* **39:** 239–248.

Gouaux J.E., Braha O., Hobaugh M.R., Song L., Cheley S., Shustak C., and Bayley H. 1994. Subunit stoichiometry of staphylococcal α-hemolysin in crystals and membranes: A heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 12828–12831.

Gu L.Q., Braha O., Conlan S., Cheley S., and Bayley H. 1999. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **398:** 686–690.

Guan X.Y., Gu L.Q., Cheley S., Braha O., and Bayley H. 2005. Stochastic sensing of TNT with a genetically engineered pore. *Chembiochem* **6:** 1875–1881.

Harrell C.C., Siwy Z.S., and Martin C.R. 2006. Conical nanopore membranes: Controlling the nanopore shape. *Small* **2:** 194–198.

Heins E.A., Siwy Z.S., Baker L.A., and Martin C.R. 2005a. Detecting single porphyrin molecules in a conically shaped synthetic nanopore. *Nano Lett.* **5:** 1824–1829.

Heins E.A., Baker L.A., Siwy Z.S., Mota M., and Martin C.R. 2005b. Effect of crown ether on ion currents through synthetic membranes containing a single conically shaped nanopore. *J. Phys. Chem. B* **109:** 18400–18407.

Hemmler R., Bose G., Wagner R., and Peters R. 2005. Nanopore unitary permeability measured by electrochemical and optical single transporter recording. *Biophys. J.* **88:** 4000–4007.

Heng J.B., Ho C., Kim T., Timp R., Aksimentiev A., Grinkova Y.V., Sligar S., Schulten K., and Timp G. 2004. Sizing DNA using a nanometer-diameter pore. *Biophys. J.* **87:** 2905–2911.

Hille B. 2001. *Ion channels of excitable membranes.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Ho C., Qiao R., Heng J.B., Chatterjee A., Timp R.J., Aluru N.R., and Timp G. 2005. Electrolytic transport through a synthetic nanometer-diameter pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 10445–10450.

Hornblower B., Whitaker R.D., Coombs A., Kolomeisky A., Meller A., and Akeson M. 2007. Single molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores. *Nat. Methods* **4:** 315–317.

Hugel T. and Seitz M. 2001. The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy. *Macromol. Rapid Commun.* **22:** 989–1016.

Ito T., Sun L., and Crooks R.M. 2003a. Observation of DNA transport through a single carbon nanotube channel using fluorescence microscopy. *Chem. Commun.* **2003:** 1482–1483.

———. 2003b. Simultaneous determination of the size and surface charge of individual nanoparticles using a carbon nanotube-based coulter counter. *Anal. Chem.* **75:** 2399–2406.

Jan Bonthuis D., Zhag J., Hornblower B., Mathé J., Shklovskii B., and Meller A. 2006. Self-energy limited ion transport in subnanometer channels. *Phys. Rev. Lett.* **97:** 128104.

Jonas D., Walev I., Berger T., Liebetrau M., Palmer M., and Bhakdi S. 1994. Novel path to apoptosis: Small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect. Immun.* **62:** 1304–1312.

Kang X.F., Cheley S., Guan X.Y., and Bayley H. 2006. Stochastic detection of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **128:** 10684–10685.

Karhanek M., Kemp J.T., Pourmand N., Davis R.W., and Webb C.D. 2005. Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Lett.* **5:** 403–407.

Kasianowicz J., Brandin E., Branton D., and Deamer D. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 13770–13773.

Kasianowicz J.J., Burden D.L., Han L.C., Cheley S., and Bayley H. 1999. Genetically engineered metal ion binding sites on the outside of a channel's transmembrane β-barrel. *Biophys. J.* **76:** 837–845.

Keyser U.F., van der Does J., Dekker C., and Dekker N.H. 2006**a**. Optical tweezers for force measurements on DNA in nanopores. *Rev. Sci. Instrum.* **77:** 105105.

Keyser U.F., Krapf D., Koeleman B.N., Smeets R.M.M., Dekker N.H., and Dekker C. 2005. Nanopore tomography of a laser focus. *Nano Lett.* **5:** 2253–2256.

Keyser U.F., Koeleman B.N., Van Dorp S., Krapf D., Smeets R.M.M., Lemay S.G., Dekker N.H., and Dekker C. 2006**b**. Direct force measurements on DNA in a solid-state nanopore. *Nat. Phys.* **2:** 473–477.

Kim M.-J., McNally B., Murata K., and Meller A. 2007. Characteristics of solid-state nanometer pores fabricated using transmission electron microscope (TEM). *Nanotechnology* **18:** 205302.

Kim M.-J., Wanunu M., Bell C.D., and Meller A. 2006. Rapid fabrication of uniform size nanopores and nanopore arrays for parallel DNA analysis. *Adv. Mater.* **18:** 3149–3153.

Lee J.W. and Meller A. 2007. Rapid DNA sequencing by direct nanoscale reading of nucleotide bases on individual DNA chains. In *Perspectives in bioanalysis: New high throughput technologies for DNA sequencing and genomics* (ed. K.R. Mitchelson), vol. 2., pp. 249–267. Elsevier, Amsterdam.

Li J., Gershow M., Stein D., Brandin E., and Golovchenko J.A. 2003. DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nat. Mater.* **2:** 611–615.

Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M.J., and Golovchenko J.A. 2001. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature* **412:** 166–169.

Lo C.J., Aref T., and Bezryadin A. 2006. Fabrication of symmetric sub-5 nm nanopores using focused ion and electron beams. *Nanotechnology* **17:** 3264–3267.

Mathé J., Arinstein A., Rabin Y., and Meller A. 2006. Equilibrium and irreversible unzipping of DNA in a nanopore. *Europhys. Lett.* **73:** 128–134.

Mathé J., Aksimentiev A., Nelson D.R., Schulten K., and Meller A. 2005. Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the alpha-hemolysin membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 12377–12382.

Mathé J., Visram H., Viasnoff V., Rabin Y., and Meller A. 2004. Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules. *Biophys. J.* **87:** 3205–3212.

Meller A. 2003. Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores. *J. Phys. Condens. Matter* **15:** R581–R607.

Meller A. and Branton D. 2002. Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore. *Electrophoresis* **23:** 2583–2591.

Meller A., Nivon L., and Branton D. 2001. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Phys. Rev. Lett.* **86:** 3435–3438.

Meller A., Nivon L., Brandin E., Golovchenko J., and Branton D. 2000. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 1079–1084.

Nakane J., Wiggin M., and Marziali A. 2004. A nanosensor for transmembrane capture and identification of single nucleic acid molecules. *Biophys. J.* **87:** 615–621.

Nilsson J., Lee J.R.I., Ratto T.V., and Létant S.E. 2006. Localized functionalization of single nanopores. *Adv. Mater.* **18:** 427–431.

Noskov S.Y., Im W., and Roux B. 2004. Ion permeation through the α-hemolysin channel: Theoretical studies based on Brownian dynamics and Poisson-Nernst-Plank electrodiffusion theory. *Biophys. J.* **87:** 2299–2309.

Sakmann B. and Neher E. 1995. *Single-channel recording.* Plenum Press, New York.

Saleh O.A. and Sohn L.L. 2003. An artificial nanopore for molecular sensing. *Nano Lett.* **3:** 37–38.

Sauer-Budge A.F., Nyamwanda J.A., Lubensky D.K., and Branton D. 2003. Unzipping kinetics of double-stranded DNA in a nanopore. *Phys. Rev. Lett.* **90:** 238101.

Schiedt B., Healy K., Morrison A.P., Neumann R., and Siwy Z. 2005. Transport of ions and biomolecules through single asymmetric nanopores in polymer films. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* **236:** 109–116.

Shao Y.H. and Mirkin M.V. 1997. Fast kinetic measurements with nanometer-sized pipets. Transfer of potassium ion from water into dichloroethane facilitated by dibenzo-18-crown-6. *J. Am. Chem. Soc.* **119:** 8103–8104.

Sherman-Gold R., ed. 1993. *The axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques.* Axon Instruments, Inc., Foster City, California.

Smeets R.M.M., Keyser U.F., Krapf D., Wu M.Y., Dekker N.H., and Dekker C. 2006. Salt dependence of ion transport and DNA translocation through solid-state nanopores. *Nano Lett.* **6:** 89–95.

Song L., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., and Gouaux J.E. 1996. Structure of staphylococcal α-hemolysin a heptameric transmembrane pore. *Science* **274:** 1859–1865.

Storm A.J., Chen J.H., Ling X.S., Zandbergen H.W., and Dekker C. 2003. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nat. Mater.* **2:** 537–540.

———. 2005a. Electron-beam-induced deformations of $SiO_2$ nanostructures. *J. Appl. Phys.* **98:** 014307.

Storm A.J., Chen J.H., Zandbergen H.W., and Dekker C. 2005b. Translocation of double-strand DNA through a silicon oxide nanopore. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **71:** 051903.

Szabò I., Bàthori G., Tombola F., Brini M., Coppola A., and Zoratti M. 1997. DNA Translocation across planar bilayers containing *Bacillus subtilis* ion channels. *J. Biol. Chem.* **272:**

25275–25282.
Vercoutere W., Winters-Hilt S., Olsen H., Deamer D., Haussler D., and Akeson M. 2001. Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. *Nat. Biotech.* **19:** 248–252.
Wang G.L., Zhang B., Wayment J.R., Harris J.M., and White H.S. 2006. Electrostatic-gated transport in chemically modified glass nanopore electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **128:** 7679–7686.
Wanunu M. and Meller A. 2007. Chemically modified solid-state nanopores. *Nano Lett.* **7:** 1580–1585.
Winters-Hilt S., Vercoutere W., DeGuzman V.S., Deamer D., Akeson M., and Haussler D. 2003. Highly accurate classification of Watson-Crick basepairs on termini of single DNA molecules. *Biophys. J.* **84:** 967–976.
Zhang B., Zhang Y.H., and White H.S. 2004. The nanopore electrode. *Anal. Chem.* **76:** 6229–6238.

（金静华　译）

# 第 19 章　无外部负载、具有高时空分辨率的单分子纳米金颗粒示踪技术

**Alexander R. Dunn　James A. Spudich**

Stanford University School of Medicine, Beckman Center,
Stanford, California 94305-5307

## 摘要

纳米金颗粒和单分子荧光团一样，可用于定位单分子，精确度可达纳米级。与光阱不同，用纳米金颗粒标记不会产生外部的负荷，这对于研究扩散过程非常重要。这样，单个金颗粒可以像单个荧光团一样来使用，可以提供相似的信息，不仅如此，单个金颗粒还具有亚毫秒的时间分辨率。单分子纳米金颗粒追踪的特性（高时间分辨率、颗粒小、没有外部的负荷）有利于对短时程中间体结构特性进行描述，如我们示例的肌球蛋白 V。本章详细介绍了单分子纳米金颗粒追踪术，包括流动池构建、显微术和数据分析，并简单介绍了肌动蛋白和肌球蛋白的实验准备。

## 概述

纳米金颗粒的优势在于对光的散射要比同样直径的塑料粒子好 1000 倍（Yguerabide and Yguerabide 1998a）。在暗场照明的情况下，它们呈现为暗背景下的亮点，这和单个荧光团类似。与熟知的单分子荧光技术一样（如 1 nm 精度荧光成像；Yildiz et al. 2003），金颗粒的定位可以达到纳米级。与荧光团不同，光子流量不受激发态寿命、光漂白或光闪烁的影响，因此，纳米金颗粒追踪可以具有亚毫秒的时间分辨率（Yasuda et al. 2001；Dunn and Spudich 2007）。与光阱不同，金颗粒标记不会产生外部的负荷，这对于研究扩散过程而言是一个极为重要的特性。因此，单个金颗粒可以像单个荧光团一样来使用，提供相似的信息，而且更具有亚毫秒的时间分辨率。

我们的工作（Dunn and Spudich 2007）建立在前人的研究基础之上（Schafer et al. 1991；Malik et al. 1994；Yasuda et al. 2001），并给出了一个具体的实例。肌球蛋白 V 沿着肌动蛋白纤维一步一步行进（De La Cruz et al. 1999；Mehta et al. 1999；Veigel et al. 2002；Churchman et al. 2005；Sellers and Veigel 2006），然而对于肌球蛋白 V 的头部从肌动蛋白纤维上分离时出现短时程中间体，这个具体过程却鲜为人知。利用纳米金颗粒标记的肌球蛋白 V 的亚毫秒暗场成像，我们直接观察了肌球蛋白头部与肌动蛋白纤维分离，向前移动，并重新结合这一运动过程（图 19-1）。我们所观察到的这种中间体的位置变化（图 19-2）与简单模型相一致，即未结合的头部绕着杠杆臂连接处自由旋转。这种方式可能有利于肌球蛋白头部通过拥挤的肌动蛋白纤维网络。纳米金颗粒追踪的特性（高时间分辨率、颗粒小、无外部负荷）使我们可以在单分子水平上描述短时程中间体的结构特性。

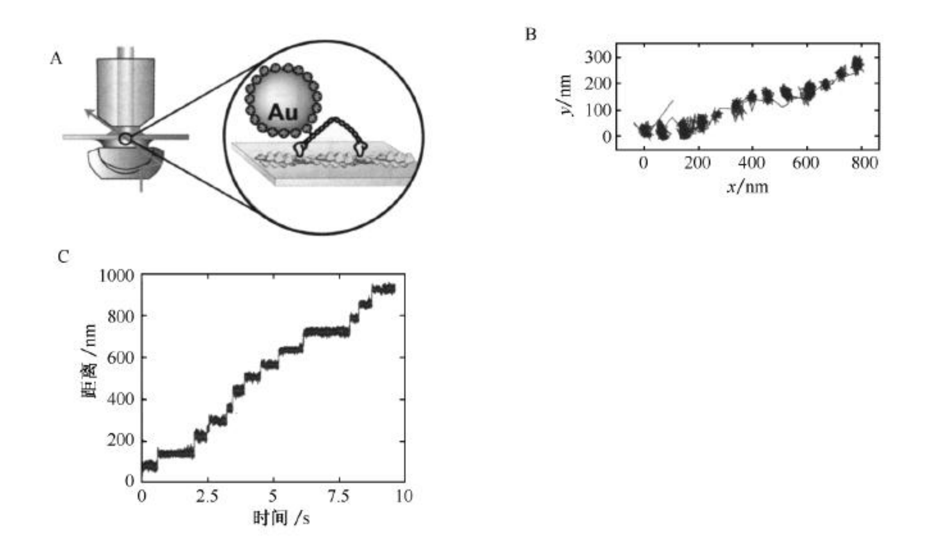



图 19-1 具有毫秒时间分辨率的肌球蛋白 V 杠杆臂的追踪。A. 一个肌球蛋白 V 二聚体在其中一个杠杆臂上通过生物素-链霉亲和素连接的方法标记上直径为 40 nm 的金颗粒(Au)。肌球蛋白 V 和金颗粒结合物沿着固定的肌动蛋白行走。金颗粒散射的光通过物镜收集，成像速度为 3125 帧/s。B. 每一帧中金颗粒的位置都被确定下来。肌球蛋白从左向右行走，产生一系列离散的阶跃。C. 样品的数据轨迹；直径 40 nm 的金颗粒，3 μmol/L ATP；每 0.32 ms 拍摄一帧（深色）；一个 16 ms 的平均滑动（浅色）。步长（74 nm）和频数都和先前报道的值相符（De La Cruz et al. 1999；Yildiz et al. 2003）。

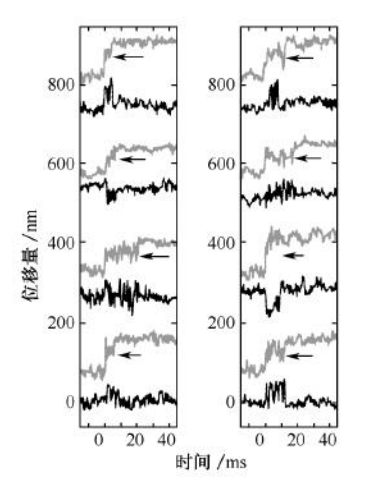



图 19-2 肌球蛋白 V 每一步移动的成像速度为 3125 Hz，使用 40 nm 的金颗粒。沿着肌动蛋白纤维丝的位移用深色表示。相应的垂直位移在下面用浅色表示。每一步的结束用箭头表示。注意在这期间肌球蛋白 V 在两个方向上位移增量的变化。瞬时的向左（正向）和向右的横向偏移都可以被观察到。观察到的位移变化增量与未结合的头部绕着杠杆臂连接处进行自由旋转的模型是一致的（Dunn and Spudich 2007）。

## 实验方案 1：单分子纳米金颗粒追踪

我们在这里对流动池构建、显微术和数据分析做了详细的描述，并简单介绍了肌动蛋白和肌球蛋白的准备工作。尽管这些细节是针对特定实验而设计，但方法却是普遍可行的。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

ABcam（5 μmol/L 钙调蛋白，用 AB 配制）

肌动蛋白储存液（用 AB 配制，pH 7.4）

10 μmol/L 肌动蛋白

肌动蛋白参照文献准备（Pardee and Spudich 1982），并用 1 mmol/L 的 DTT 代替 β-巯基乙醇。

1 mmol/L ATP

1 mmol/L DTT< !>

6.7 μmol/L 次毒蕈环肽< !>

3.3 μmol/L 四甲基罗丹明-次毒蕈环肽（Invitrogen）< !>

肌动蛋白储存液可以在 4℃保存一个月。

实验缓冲液（AB；pH 7.4）

25 mmol/L 咪唑< !>

25 mmol/L 氯化钾

4 mmol/L 氯化镁

1 mmol/L EGTA

生物素-马来酰亚胺（50 mmol/L，溶解于 DMSO；Sigma-Aldrich）< !>

分装冻存于−80℃，只能冻融一次。

生物素化缓冲液（pH 7.5）

5 mmol/L 氯化钙< !>

20 mmol/L 咪唑< !>

牛血清白蛋白，99%（BSA；Sigma-Aldrich）

氯化钙（10 mmol/L）< !>

钙调蛋白

海胆脊椎动物样钙调蛋白突变体 Q143C 参照文献纯化（Churchman et al. 2005）。

透析缓冲液（pH 7.5）

0.5 mmol/L DTT< !>

0.5 mmol/L EGTA

10 mmol/L 咪唑<!>

EGTA (500mmol/L, pH 8.0)

交换缓冲液 (pH 7.5)

25 mmol/L 咪唑<!>

25 mmol/L 氯化钾

4 mmol/L 氯化镁

GO 缓冲液 (pH 7.4)

ABcam 配制

3 μmol/L ATP

100 nmol/L 生物素

0.04 mg/ml 过氧化氢酶

0.1 mg/ml 肌酸磷酸激酶

0.4 % (*m*/*V*) 葡萄糖

0.2 mg/ml 葡萄糖氧化酶<!>

1 mmol/L 磷酸肌酸

金颗粒，直径 40 nm，链霉亲和素交联 (15840D-4, Ted Pella) <!>

肌球蛋白

参照文献表达和纯化小鸡肌球蛋白 V/GCN4 与钙调蛋白的融合表达蛋白 (Churchman et al. 2005)。

硝酸纤维素 (12620-10, Electron Microscopy Sciences)，用 *n*-戊基乙酸配制成 0.1%溶液<!> (>99%; W504009, Sigma-Aldrich)

用于 MALDI-质谱仪的试剂，单独列出

表面钝化多聚物 [如 PLL (20)-g [3.5] -PEG (2)/PEG (3.4)-生物素 (本实验方案) 或 PLL (20)-g [3.5]-PEG (2)；表面溶剂，GmbH；用 PBS 配成1 mg/ml]

Tris (2 mmol/L, pH 8.0)

## 设备

气垫桌 (Newport Optics)

缓冲液交换柱 (Micro Bio-Spin 6; BioRad)

相机 (Andor DV860 EMCCD)

聚光器 (反射球, 1.2~1.33 NA; Olympus)

盖玻片 (no.1 重量)

用于 MALDI-质谱仪的设备，单独列出

护目镜，防激光 (532 nm)

栅极 (10 μm; Technical Instrument, San Francisco)

激光 (相干的泵浦二极管固态激光, 523 nm, 100 mW) <!>

这是 Class IIIB 激光，能导致眼睛的不可逆损伤，所以必须全程戴上激光护目镜。

显微镜

正置显微镜，有标准的可见光镜和座架，水浸固定长度的物镜（40×，0.9 NA）（Zeiss）。

等离子清洁器（PDC-32C；Harrick Plasma）

载玻片（3050，金封）

双面胶带（透明；Scotch）

## 方法

### 半胱氨酸特异的生物素标记钙调蛋白

1. 用 BioRad Micro Bio-Spin 6 缓冲液转换柱将 Q143C 钙调蛋白的缓冲液换成生物素化缓冲液，将蛋白质的终浓度调整为 0.7 mg/ml。
2. 加入生物素-马来酰亚胺，使其浓度为 0.5 mmol/L。22℃孵育 1 h。
3. 在透析缓冲液中 4℃透析过夜。
4. 用 MALDI-质谱仪检测生物素化程度。
5. 将样本分装速冻，储存于－80℃。

### 将生物素标记的钙调蛋白与肌球蛋白相连

以下是对将生物素标记的钙调蛋白与肌球蛋白 V 相连方案的轻微调整（Churchman et al. 2005）。

6. 将野生型生物素化的钙调蛋白加入交换缓冲液，调整其终浓度为 0.75 μmol/L。
7. 加入肌球蛋白 V（约 70 nmol/L 重链），22℃孵育 2 min。
8. 加入氯化钙至终浓度为 1 mmol/L，引发钙调蛋白交换。孵育 5 min。
9. 用终浓度为 8 mmol/L 的 EGTA 终止反应。

### 链霉亲和素介导的共轭结合

10. 用 2 mmol/L Tris（pH 8.0）将 30 μl 纳米金-链霉亲和素共轭物稀释为 1 ml，14 000 *g* 离心 2 min，用 30 μl 的 2 mol/L Tris（pH 8.0）重悬沉淀，重复两次（共洗三次）（见排疑解难）。
11. 用 ABcam 1∶1 稀释金颗粒（见排疑解难）。
12. 在金颗粒悬浮物中加入一系列稀释度的生物素化的肌球蛋白 V（见步骤 6～步骤 9）。最后肌球蛋白 V 和金颗粒的终浓度分别约为 50 pmol/L 和 300 pmol/L。以确保每个金颗粒上结合肌球蛋白 V 二聚体小于或等于 1。因为存在差异，因此应测试肌球蛋白与金颗粒结合的比例范围，并选用最低比率来产生移动的颗粒（见排疑解难）。

    肌球蛋白 V-金颗粒共轭交联物在 4℃可稳定数小时。

### 液流池组装

根据肌动蛋白纤维从载玻片表面释放的条件考虑，实验在高离子强度条件下进行，并且需要一个可变的液流池（见步骤 14 ii）。

13. 将玻片置于等离子清洗器中，高强度，压力大约为 2 Torr（1 Torr＝1.333 22×$10^2$ Pa），清洗 1 min。选择进入步骤 14 i 或步骤 14 ii。

14. 有两个选择。

   i. 正常液流池组装。

      a. 用双面透明带和盖玻片组装一个简单的液流池（Rock et al. 2000）。

      b. 加入 15 ml 1 mg/ml 生物素化的 PEG-多聚赖氨酸交织的异源多聚体（PBS 配制）到液流池中，孵育 30 min（Valentine et al. 2006）。

      多聚物能钝化表面，在我们特定实验中，多聚物也提供了弱的相互作用以固定肌动蛋白。在我们的实验中，生物素化的 PEG-多聚赖氨酸不是那么重要。

      c. 用 15 μl AB 洗池两次。

      d. 用 AB 溶液以 1∶20 的比例稀释肌动蛋白储存液，用此溶液洗池 4 次，每次 10 μl。

      轻柔取用，靠重力流动以避免移出肌动蛋白纤维。

      e. 用 15 μl AB 清洗两次，去除多余的肌动蛋白。

      f. 用 ABcam 以 1∶3 的比例稀释金颗粒共轭偶联的肌球蛋白 V，取 10 μl 加入到液流池，孵育 10 min，以便更好地结合肌动蛋白。

      g. 用 15 μl ABcam 去除未结合的颗粒。

   ii. 高离子强度下的应用。

      a. 用 0.1 % *n*-戊基乙酸配制的硝酸纤维素以 4000 r/min 离心 40 s 包被玻片。

      b. 用双面透明带和盖玻片聚集一个简单的液流池。

      c. 用 AB 溶液以 1∶20 的比例稀释肌动蛋白储存液，取 10 μl 加入到池中，孵育 2 min。

      d. 用 15 μl AB 清洗两次，去除多余的肌动蛋白。

      e. 加入 15 μl 表面钝化多聚物（PBS 配制的 1 mg/ml 生物素化的 PEG-多聚赖氨酸交织的异源多聚体）到液流池中，孵育 30 min。

      f. 加入 15 μl 10 mg/ml 的 BSA 进一步减少金粒子黏附，孵育 2 min。

      g. 用含 1 mg/ml BSA 的 ABcam 以 1∶3 的比例稀释金共轭偶联的肌球蛋白 V，取 10 μl 加入到池中，孵育 10 min，以便更好地结合肌动蛋白。

      h. 用含 1 mg/ml BSA 的 ABcam 15 μl 去除未结合的颗粒。

15. 加入 10 μl 的 GO 缓冲液。

## 显微术

16. 用暗场照明检测液流池（图 19-1），以 100 mW，532 nm 的激光器作为光源，1-OD 中等灰度滤光片衰减光功率到 10 mW 左右。运用一个 1.2～1.33 NA 的反射球状聚光镜聚焦和引导激光通过液流池。用一个 40×0.9 NA Zeiss 水浸固定长度的物镜来收集散射光（见排疑解难）。

    在数据收集时，保持样本在（20±2）℃。

17. 用 Andor DV860 背照明的 EMCCD 相机记录图像，帧速至 3125 Hz（详见排疑解难）。

18. 用 10 μm 的栅格校准像素。

校准像素时的不确定性为 0.35%，由栅极间平均距离测量而得。

## 结果

我们实验方案中使用的金粒子要比显微镜衍射限制小很多，因此被单个金粒子散射的光可以看做是从点光源发出来的。收集到的光子会在 CCD 上形成一个艾里斑（Airy disk），我们利用二维高斯函数进行拟合。将原始数据输入到 Matlab 中，利用双高斯拟合来确定每帧中艾里斑的中心（Thompson et al. 2002；Yildiz et al. 2003；Okten et al. 2004；Churchman et al. 2005）。肌动蛋白纤维的形状可以利用一个二阶多项式来表示，将其拟合到记录的颗粒轨迹。图 19-1C 的数据对应于在肌动纤维上行走的距离。

我们分析了收集到的 40 个固定的粒子数据，所有的粒子都是 40 nm 的金颗粒，在 3125 Hz 记录。选择 144 ms 的窗口时间用于定位。平均起来，粒子的中心在 $x$ 轴方向和 $y$ 轴方向分别具有标准差 $\sigma_x=11.6$ nm 和 $\sigma_y=10.6$ nm。10%的黏附颗粒具有最低的标准差 $\sigma_x=6.8$ nm 和 $\sigma_y=5.8$ nm。这些数据可能代表了设备的电流噪声的极限。

我们主要考虑大的运动（如> 10 nm），因此，我们不必竭尽全力地排除外部噪声。空间分辨率的明显提高依赖于振动隔离度的提高和空气处理控制，类似于在光阱设计应用中的方法（Abbondanzieri et al. 2005）。

## 排疑解难

**问题**：粒子黏在玻璃表面。

［**步骤 16**］

**解决方法**：应用步骤 14 i 或步骤 14 ii 来改变表面钝化。在运行其他的实验系统时，有些经验对修改这些方案会有帮助：我们发现 PEG-多聚赖氨酸异源多聚体在减少非特异黏附中很有作用，值得肯定。在我们的操作中，链霉亲和素包被的金粒子黏附在包被了链霉亲和素、抗生物素蛋白，或是中性的抗生物素蛋白的表面。最后，其他的表面钝化蛋白，显著的如酪蛋白，在一些应用中更倾向于 BSA。

**问题**：粒子消失或变紫色，预示粒子降解。

［**步骤 10～步骤 12**］

**解决方法**：裸露的金粒子只能溶于离子强度很低的溶液（如< 5mmol/L 的溶液）。幸运的是，金粒子蛋白质共轭复合物溶于普通的缓冲液，在我们的操作中，储存的共轭物非常稳定。自制的共轭物应该更讲究一些，为了避免降解，应该在低离子强度下操作，包括溶液中的钝化的中介（如 BSA）或是买新的共轭颗粒。

**问题**：校准照明和收集光路的困难。

［**步骤 16**］

**解决方法**：建立仪器之初校准有些难度。成像散射很强的微米级别的二氧化硅颗粒或是聚苯乙烯颗粒对于校准是很有帮助的。先用明场或是荧光成像寻找物体的焦平面，再调节暗场照明光束到这个固定的视场也会很有帮助。

## 讨论

### 金颗粒追踪的优缺点

单分子追踪的精确定位依赖于每帧收集到的光子数量。凭经验来说，每幅有 $10^4$ 光子对于纳米定位已经足够（Thompson et al. 2002；Yildiz et al. 2003）。然而，这么大量的光子数的获得却抑制了点定位法所能获得的最大时间分辨率。忽略其他因素，一个典型的荧光团寿命为 1 ns，一个有 1%光子检测效率的显微镜能产生 100 Hz 的帧速率，然而，这种计算忽略了荧光团的漂白和闪烁以及背景噪声等所有潜在的实验困难。尽管量子点给人以希望，荧光标记目前还是缺乏进行亚毫秒级定位的光子流量。

金颗粒追踪提供了亚毫秒级的时间分辨率和纳米级的空间分辨率，而且不会产生外部的负荷。金颗粒作为单分子标记有额外的现实意义上的好处，它们的发射峰在 532 nm（Yguerabide and Yguerabide 1998b），与普遍的倍频 Nd：YAG 激光器相匹配。金颗粒与链霉亲和素、蛋白 A、各种抗体的偶联物都有商业化供应（Ted Pella）。因为金颗粒在电子显微镜标记、诊断学以及其他的一些操作中都有应用，所以有大量的关于它们操作和衍生的相关文献（Schultz et al. 2000；Parak et al. 2003；Daniel and Astruc 2004；Doty et al. 2004；Sonnichsen et al. 2005）。

与其他技术一样，纳米金颗粒的暗场成像有缺陷。由于入射光和散射光之间没有斯托克斯位移，这就意味着利用滤光片很难将激发光过滤掉。此外，外部的污垢和表面干涉也可以引起明显的入射光散射，产生背景问题。金颗粒（直径约 40 nm）略大于量子点（直径约 20 nm），远大于荧光分子（直径约 1 nm）。单分子荧光实验往往依靠光漂白来除去视场内不感兴趣荧光分子的荧光。由于金颗粒不会发生光漂白，黏附的金颗粒会留在视场内。

### 理论依据

当设计单分子纳米金颗粒实验时，只有几个简单的公式需要考虑。一个粒子产生的散射光强 $I$ 的瑞利等式为

$$I \infty \frac{\alpha^6}{\lambda^4}\left|\frac{(m/n)^2-1}{(m/n)^2+2}\right|^2$$

式中，$\alpha$ 为粒子的半径；$\lambda$ 为照明光的波长；$m$ 为粒子的折射率；$n$ 为介质的折射率（水为 1.33；Yguerabide and Yguerabide 1998a）。金的折射率是复数，在 530 nm 处近似表达为 $0.3+2i$，然而对于聚苯乙烯，其 $m$ 的值是 1.6。这种材料特性的差别意味着金颗粒的散射强度是同样大小的聚苯乙烯的 1000 倍。然而，散射强度也依赖 $\alpha^6$，这意味着一个 40 nm 的金颗粒与一个 125 nm 的聚苯乙烯具有相同的散射强度。

粒子半径在三个方面可以影响实验的成功。在空间位阻不能忽略的情况下，更小的标记物更得到青睐。使用更小的粒子可以提高时间分辨率。在线性电势内一个颗粒子的弛豫时间为

$$\tau = \frac{\gamma}{\kappa} = \frac{6\pi\eta\alpha}{\kappa}$$

式中，$\gamma$为阻力系数；$\eta$为介质的黏滞系数；$\alpha$为粒子半径；$\kappa$为粒子-肌球蛋白连接段的硬度。如果 $\kappa$=1 pN/nm，可以得到 $\tau$是 0.3 μs，相对于目前的测量能力而言，这个时间非常短。然而，对于在一个旋转势内旋转的粒子，其弛豫时间为（Yasuda et al. 1996）

$$\tau_{rot} = \frac{\gamma}{\kappa} = \frac{14\pi\alpha^3\eta}{\kappa}$$

如果 $\kappa$=1 pN/nm，对于直径分别为 40 nm 和 125 nm 的粒子，$\tau_{rot}$分别为 0.4 ms 和 12 ms。可以看出，使用尽可能小的粒子可以明显提高实验测量的时间分辨率。同时，这些粗略的计算也表明粒子的弛豫时间主要由粒子旋转自由度的旋转程度决定。

## 仪器设备

已知的实验都使用快速相机（Dunn and Spudich 2007）来追踪。互补金属氧化物半导体（CMOS）相机具有优良的时间分辨率（约 10 kHz）和像素数。然而，它们的量子效率低。相比，EMCCD 相机具有非常高的探测效率，但是最大的帧速只有 3 kHz（Yasuda et al. 2001）。这两种相机都已经被成功地应用在实验中。CMOS 相机的一个可能的不足是，CMOS 工作时所需要的高照明功率（约 200 mW）在原理上可以对粒子产生一定的力（0.01～0.1 pN）。这个力可能对大部分测量没有影响，但是可能会干扰粒子的扩散过程。我们使用一个 100 mW 激光器，但是实验中衰减了其大部分功率。相似的测量可以利用不是很贵也很安全的 10～25 mW 激光器来实现。

目前，已经发表的金颗粒追踪实验已经具备毫秒或者更好的时间分辨率。很多有趣的过程往往发生在 10～100 μs 的时间尺度。利用雪崩光电二极管象限仪或者位置敏感设备追踪单个粒子在原理上可以提供更好的时间分辨率。在这些时间尺度，粒子弛豫时间变得重要，这样利用更为坚硬的材料来连接感兴趣的分子和使用更小的粒子是必需的。

据我们所知，目前发表的金颗粒追踪测量往往采用广场照明技术。在原理上，全内反射（TIR）照明可以减少由于离焦粒子产生的背景干扰。此外，TIR 照明可以允许更高的粒子浓度，这样可以提高实验的通量。基于 TIR 的暗场照明几何学已经被提出，这样，在原理上可以用于金颗粒追踪实验（Braslavsky et al. 2001；Zocchi 2001；Dornier et al. 2004）。

## 参考文献


Abbondanzieri E.A., Greenleaf W.J., Shaevitz J.W., Landick R., and Block S.M. 2005. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438:** 460–465.

Braslavsky I., Amit R., Ali B.M.J., Gileadi O., Oppenheim A., and Stavans J. 2001. Objective-type dark-field illumination for scattering from microbeads. *Appl. Opt.* **40:** 5650–5657.

Churchman L.S., Ökten Z., Rock R.S., Dawson J.F., and Spudich J.A. 2005. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 1419–1423.

Daniel M.-C. and Astruc D. 2004. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **104:** 293–346.

De La Cruz E.M., Wells A.L., Rosenfeld S.S., Ostap E.M., and Sweeney H.L. 1999. The kinetic mechanism of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 13726–13731.

Dornier A., Busoni L., Zeldovich K., Guirao B., Robin G., Cappello G., and Prost J. 2004. Kinesin step without external force takes less than 70 microseconds. *J. Biol. Phys. Chem.* **4:** 74–78.

Doty R.C., Fernig D.G., and Lévy R. 2004. Nanoscale science: A big step towards the holy grail of single molecule biochemistry and molecular biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **61:** 1843–1849.

Dunn A.R. and Spudich J.A. 2007. Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14:** 246–248.

Malik F., Brillinger D. and Vale R.D. 1994. High-resolution tracking of microtubule motility driven by a single kinesin motor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 4584–4588.

Mehta A.D., Rock R.S., Rief M., Spudich J.A., Mooseker M.S., and Cheney R.E. 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400:** 590–593.

Ökten Z., Churchman L.S., Rock R.S., and Spudich J.A. 2004. Myosin VI walks hand-over-hand along actin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 884–887.

Parak W.J., Gerion D., Pellegrino T., Zanchet D., Micheel C., Williams S.C., Boudreau R., Le Gros M.A., Larabell C.A., and Alivisatos A.P. 2003. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* **14:** R15–R27.

Pardee J.D. and Spudich J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* **85:** 164–181.

Rock R.S., Rief M., Mehta A.D., and Spudich J.A. 2000. In vitro assays of processive myosin motors. *Methods* **22:** 373–381.

Schafer D.A., Gelles J., Sheetz M.P., and Landick R. 1991. Transcription of single molecules of RNA polymerase observed by light-microscopy. *Nature* **352:** 444–448.

Schultz S., Smith D.R., Mock J.J., and Schultz D.A. 2000. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 996–1001.

Sellers J.R. and Veigel C. 2006. Walking with myosin V. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18:** 68–73.

Sonnichsen C., Reinhard B.M., Liphardt J., and Alivisatos A.P. 2005. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **23:** 741–745.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82:** 2775–2783.

Valentine M.T., Fordyce P.M., Krzysiak T.C., Gilbert S.P., and Block S.M. 2006. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. *Nat. Cell Biol.* **8:** 470–476.

Veigel C., Wang F., Bartoo M.L., Sellers J.R., and Molloy J.E. 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat. Cell Biol.* **4:** 59–65.

Yasuda R., Miyata H., and Kinosita K., Jr. 1996. Direct measurement of the torsional rigidity of single actin filaments. *J. Mol. Biol.* **263:** 227–236.

Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinosita K., Jr., and Itoh H. 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of $F_1$-ATPase. *Nature* **410:** 898–904.

Yguerabide J. and Yguerabide E.E. 1998a. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. I. Theory. *Anal. Biochem.* **262:** 137–156.

———. 1998b. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. II. Experimental characterization. *Anal. Biochem.* **262:** 157–176.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

Zocchi G. 2001. Force measurements of single molecular contacts through evanescent wave microscopy. *Biophys J.* **81:** 2946–2953.

（艾 恒 译）

# 第 20 章　基于表面的单分子检测技术的进展

**Polly M. Fordyce**[*,†]　**Megan T. Valentine**[*,‡]　**Steven M. Block**[‡,§]

Departments of[†] Physics,[‡]Biological Sciences, and [§] Applied Physics,

Stanford University, Stanford, California 94305

[*]这两位作者对该工作的贡献相同

## 摘要

光阱检测（optical trapping assay）要求控制细胞骨架微丝或马达蛋白黏附在盖玻片或聚合胶体珠子上，而单分子荧光检测要求这些载体材料表面（下文直接称为表面）能够结合细胞骨架微丝但不结合荧光染料。传统上很多单分子检测依赖于马达蛋白、微丝和表面非特异性结合，这些技术很难延伸到新的马达蛋白，限制了基于微丝和微管的新马达蛋白的研究应用。本章概述了表面处理的物理原理，重点强调基于聚合物的表面化学方法，新方法使得马达和微丝能牢固地、立体地结合到表面并能抑制非特异性结合。本章末收录了一些常用的实验方案。

## 概述

驱动蛋白（kinesin）、动力蛋白（dynein）和肌球蛋白（myosin）超家族成员在细胞转运、细胞分裂、肌肉收缩和黑素体（melanosome）迁移中起了非常重要的作用。为了完成这些不同的任务，分子马达利用 ATP 水解产生的能量驱动蛋白沿着细胞骨架微丝一步步移动。不同的驱动蛋白和肌球蛋白具有相似的结构：结合“货物”的尾部通过柄部连着一保守的能同时和核苷酸及细胞骨架微丝相连的催化区域（Kull et al. 1996）。而动力蛋白明显比驱动蛋白和肌球蛋白大，有一个和微管结合的杆部和 6 个相连的 AAA-ATPase（腺苷三磷酸酶与多种细胞活动相关）形成一个环（Marx et al. 2005）。不同的进化压力也引起三种马达蛋白功能上的差异：驱动蛋白和动力蛋白沿着微管滑行，而肌球蛋白沿着肌动蛋白微丝滑行；在 ATP 存在的情况下驱动蛋白能够牢牢地结合在微丝上，而 ATP 却导致肌球蛋白和动力蛋白与微丝微管分离（Romberg and Vale 1993）；驱动蛋白和肌球蛋白仅含有一个 ATP 结合位点，而动力蛋白含有多个结合和水解 ATP 的位点（Kon et al. 2004；Takahashi et al. 2004）。就算是同一家族成员也有差异，不同的驱动蛋白和肌球蛋白家族成员作为单体（Okada et al. 1995）、双体（Block et al. 1990；Zhang and Hancock 2004）或更高层级的组装（Cole et al. 1994；Klopfenstein et al. 2002；Kapitein et al. 2005）沿微丝不同方向运动（Walker et al. 1990；Svoboda et al. 1993；Endow and Waligora 1998；Mehta et al. 1999；Wells et al. 1999）。

单分子技术可以观察和描述单一马达分子沿着线性基质运动的特征。光阱检测已被用于高分辨率地跟踪单个马达分子的位置，使得测量马达行进的步长和离解前位移的平

均步数（行进性机制）成为可能（Svoboda et al. 1993；Finer et al. 1994；Uyeda et al. 1996；Guilford et al. 1997；Mehta et al. 1999；deCastro et al. 2000；Purcell et al. 2002；Tominaaga et al. 2003；Mallik et al. 2004；Rock et al. 2005；Toba et al. 2006；Valentine et al. 2006）。更进一步地说，光阱检测能够通过控制负荷，来检测马达分子能够产生和对抗的最大作用力（Finer et al. 1994；Visscher et al. 1999；Block et al. 2003；Mallik et al. 2004；Toba et al. 2006）。对于解离前能够连续步进的马达，光阱能用来阐明周期运动的力学特征。运用新方法已经详细阐明了常规驱动蛋白，有丝分裂驱动蛋白 Eg5 和其他一些非常规肌球蛋白的运动模式（Block et al. 2003；Altman et al. 2004；Purcell et al. 2005；Veigel et al. 2005；Valenine et al. 2006），而传统生物学方法根本无法探测这些依赖力的运动状态的转换。单分子荧光检测也能提供定位信息可以用来监测步进循环时马达区域的相对运动和蛋白寡聚态的运动（Vale et al. 1996；Sosa et al. 2001；Forkev et al. 2003；Yildiz et al. 2003，2004；Okten et al. 2004；Ross et al. 2006；Toba et al. 2006）。这两种技术已被联合应用来阐述单一肌球蛋白 II 的机械步进和运动的生化周期（用荧光标记的 ATP 的出现来表征）（Ishijima et al. 1998），这给其他马达蛋白的研究提供了示例。

在所有的应用中，单分子检测需要控制蛋白质结合到表面。虽然在有些场合非特异性结合也能满足实验需要，而更常见的是需要使用复杂的表面处理和一定的黏附方案来控制表面作用，防止非特异性黏附。本章突出介绍几种常用的基于肌动蛋白和微管的马达蛋白的体外单分子检测的检测模型和表面化学处理方法。重点强调新型的基于聚合物的表面处理方法，使表面能够牢固地、空间特异性地结合马达和微丝，并能抑制非特异性结合。本章提供了完成上述任务的详细实验方案和重点提示。

## 光阱检测

已有一些精彩的文章系统地综述了光阱检测原理和仪器结构（Svoboda and Block 1994a；Visscher and Block 1998；Neuman and Block 2004）；本节不再赘述仅做简单介绍。当高数值孔径（numerical-aperture，NA）的显微物镜聚集一强激光束到衍射受限的样本上时会产生光阱，当一个微米量级的电解质小球接近这一激光光束的中心时，受到两种作用力：梯度力和散射力。与激光强度空间梯度成比例的梯度力吸引着电解质小球到激光束中心。由光子辐射施加并与激光强度成比例的光子散射力吸引小球沿着光束的传播方向运动。校正激光束，使得激光束溢出 NA≥1.3 的显微镜物镜的后方数值孔径，这时梯度力占了主导作用，小球在三维空间被牢牢地限定住。

单个马达分子能够附着在电解质胶态珠上而被稳定地捕获，使得同时高分辨定位示踪和加载受控负荷成为可能（Block et al. 1990，2003；Visscher et al. 1999）。行进的马达可以通过将马达蛋白黏附在一珠子上，并用光阱来操控马达蛋白靠近固定在盖玻片上的细胞骨架微丝来监测其周期动力改变（图 20-1A）。非行进的马达需要双光阱模型（三珠子检测）（Finer et al. 1994）：细胞骨架微丝分别贴附在由不同光阱控制的珠子上，马达蛋白以低密度形式贴附在 1 个平台上（通常为其他微粒）并贴在盖玻片表面（图 20-1B）。操控悬着的微丝接近平台，使马达蛋白和微丝有短暂的相互作用，双光阱则可检测马达的结合，测量微丝的移位。本章描述的技术集中在单珠子检测模型，该模

型将微丝固定在盖玻片表面，该模型的原理可用于理解其他的检测模型。

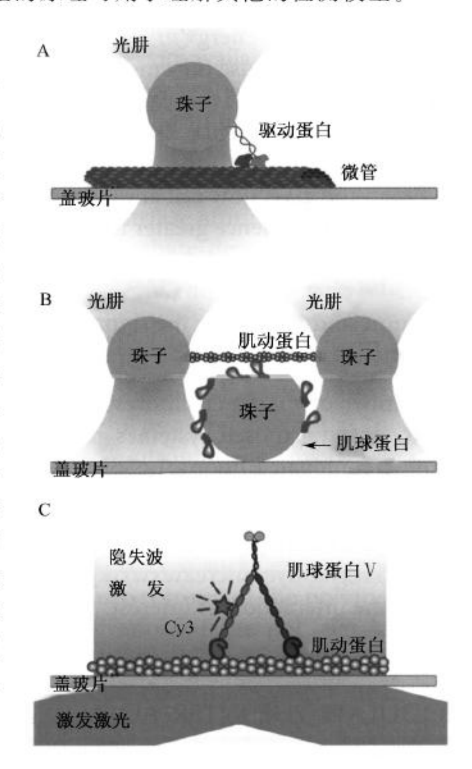



图 20-1 几种单分子检测图例。A. 驱动蛋白的单珠子光阱检测。光阱用来调控固定在珠子上的驱动蛋白靠近附着在表面的微管。B. 肌球蛋白 II 的三珠子光阱检测。肌动蛋白微丝的两头分别由光阱调控，悬挂于固定在盖玻片上包被有肌球蛋白 II 的珠子上，形成一个支架。C. 肌球蛋白 V 的单分子荧光检测。肌球蛋白 V 在钙调蛋白亚单位的头部标记上 Cy3，肌球蛋白沿着固定在盖玻片上的肌动蛋白微丝滑行。隐失波（evanescent wave）穿透溶液中的小段距离作为 Cy3 的激发光，发射光由微光相机检测。

单珠子光阱实验需要满足以下几个条件：①马达蛋白必须牢固地黏附在珠子上以确保准确地测量位置和力。另外，为确保马达的行进，珠子还需含有过量的马达结合位点，每个小珠从不到一个马达到含有多个马达，符合统计学上珠子数量和马达浓度的需要。②微丝必须牢固地结合在盖玻片表面，防止错误地把负荷引起的滑动和基质热起伏解释为马达的运动。热起伏会夸大酶的随机性检测，一种在动力周期中用来确定限速步骤数目的工具（Schnitzer and Block 1995；Shaevitz et al. 2005）。③马达包被的珠子不能黏附在盖玻片的表面，因为即使珠子和盖玻片的短暂作用也会引起马达运动的错误解释。

## 单分子荧光检测

已有文章详细综述了荧光原理和实验技术（Peterman et al. 2004；Wazawa and Ueda 2005）。简单地说，在单分子荧光检测中，荧光染料分子吸收了激光的光子而被激发，然后荧光分子通过发射更长波长（更低能量）的光子返回到它的低能量基态。由于发射的光子具有和激发激光不同的光谱，通过光学过滤它们可被分离出来且能被高灵敏地检测到。最常见的单分子荧光检测利用物镜型或棱镜型成像系统的全内反射荧光显微镜（TIRFM）将激发光斜射在玻璃和溶液样本的界面上。当入射角大于临界角时，就会在界面发生全内反射，由此产生的隐失波传播到溶液中（图 20-1C）。隐失波的光强

度随界面距离呈指数关系衰减，限制了激发光的范围，增加了定位于表面的荧光团的检测信噪比。

对于利用光阱来检测单分子荧光有几个约束条件：①需要重组蛋白质。目的蛋白质常常需要和绿色荧光蛋白（GFP）家族的某一种融合或加上生物素标签或突变去除天然暴露在表面的半胱氨酸，引入新的半胱氨酸标记上马来酰亚胺交联的荧光团。对于结合化学机制的研究，常需要荧光标记核苷酸。②由于微丝的热起伏会干扰跟踪标记的蛋白质，所以细胞骨架基质必须牢固地结合在盖玻片的表面。③染料标记的蛋白质和核苷酸必须与盖玻片表面相斥。染料的非特异性黏附会增加信号的背景，使得蛋白质示踪变得困难，而且还可能制造出相互作用的假象。

## 表面包被对界面能量的调节

蛋白质或蛋白质包被的珠子与底物表面的吸附，以及蛋白质引起的珠子聚集显著地阻碍了单分子检测的新进展。而表面包被常被用来改变蛋白质与底物表面结合的界面能量以降低非特异性吸附。虽然要全面计算一个系统的界面能量几乎不可能，但定性地理解占主导的表面相互作用对于单分子检测时选择合适的包被试剂有重要的作用。

### 非离子型相互作用

疏水作用是一种强影响蛋白质-盖玻片和蛋白质-珠子界面能量的非离子作用（Israelachvili 1992）。蛋白质同时含有疏水和亲水氨基酸残基，由于疏水区域在溶液中的能量障碍很高，蛋白质构象折叠的平衡结果通常是将疏水残基包埋在蛋白质中心而将亲水部分伸展到溶液中。一些表面通过使蛋白质疏水部分黏附伸展，排除空隙内的水分，从而使这种折叠构象不稳定；这种表面引起的蛋白质变性的可能性随表面疏水性的增加而增加。第二个非离子作用力是范德华吸引力，它由极性分子的偶极-偶极相互作用和色散力产生。虽然范德华力普遍存在，但由于近距离的静电排斥作用，使得范德华力在许多场合都可忽略（Russel et al. 1998; Israelachvili 1992）。

由于疏水作用引起的表面黏附是最容易克服的，只要对表面进行预处理，增加亲水性并降低目的蛋白去折叠的可能性（Valagao Amadeu Do Serro et al. 1999）。一种常用的方法是将盖玻片、玻璃或聚合物微珠包被上球蛋白（称为封闭蛋白）来形成一层自组装的亲水膜。包被蛋白可用牛血清白蛋白（BSA）和酪蛋白，甚至可用氧清除剂，如葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶。另一种可选方案是用非离子型表面活性剂（如 Tween 20）来处理。这些与底物表面有高亲和力的亲水分子具有价格便宜、容易购买得到、处理流程简单等优点。

尽管有上面提到的优点，封闭蛋白和表面活性剂还是有一些局限。最主要的是稳定的亲水膜的形成对表面清洗过程和缓冲液条件很敏感，降低了实验的可重复性。另外，由于封闭蛋白和表面活性剂并不是共价结合到表面，随时间延长它们可能与表面解离，也可被一些有异常高表面亲和力的马达蛋白置换。特别是使用酪蛋白时对于依赖磷酸的腺苷三磷酸酶的速率判断会产生问题，因为酪蛋白可能含有磷酸污染（Schief et al. 2004）。尽管有缺陷，封闭蛋白系统仍被广泛地应用于常规的驱动蛋白（Kuo and She-

etz 1993；Svoboda and Block 1994b；Higuchi et al. 1997；Uemura et al. 2002；Block et al. 2003；Kawaguchi et al. 2003)、非常规肌球蛋白（Nishikawa et al. 2002；Uemura et al. 2004；Clemen et al. 2005）和动力蛋白（Wang et al. 1995；Sakakibara et al. 1999；Kojima et al. 2002；Mallik et al. 2004；Ross et al. 2006）的研究。对于首次尝试建立“快速而非最好”的检测手段尤为见效。

第二种增加亲水性的包被方法包括共价结合或非特异吸附非离子型聚合物。聚乙二醇（PEG）能很好地降低蛋白质亲和力而在生物医学和研究中广泛地用于降低蛋白质结合（Prime and Whitesides 1991；Benesch et al. 2001；Bhadra et al. 2002)。PEG 包被的表面所具有的排斥性归因于聚合物链压缩引起的构象熵的减少和蛋白质碰撞产生的聚合物能量消耗的去溶剂化引起的立体效应。将具有末端 *N*-羟基丁二酰亚胺活化酯的双功能 PEG 共价结合到氨基包被的表面可以防止随时间和加载负荷产生的去吸附。然而，这需要适当延长孵育时间，降低了实验效率。

近年来出现的共聚物系统提供了一个具吸引力的共价交联替代方案，这些共聚物包含大量延伸到溶液中的 PEG 以防止蛋白质吸附，另一种被应用到盖玻片表面的聚合物能在界面自组装而不共价黏附。一类基于 PEG 的共聚物，商业名为普朗尼克（Pluronic，可从 BASF Performance Chemicals 公司购得），结构为聚乙烯-PEG-聚乙烯段（Amiji and Park 1992)。聚乙烯（PE）段有很强的疏水性且能黏附在多种底物表面；而用硅烷化剂（如二甲基二氯硅烷）预处理盖玻片可以增加疏水吸引。第二类以 PEG 为基础的共聚物，如多聚赖氨酸-PEG 接合的共聚物（可从 SurfaceSolutionS 购得），依靠静电相互作用来自组装（VandeVondele et al. 2003)。带正电荷的多聚赖氨酸（PLL）与带负电荷的清洁盖玻片相互吸引，而电中性的 PEG 链延伸到溶液中。

不管是共价结合还是自组装在盖玻片或珠子表面，PEG 聚合物都是非常有效的蛋白质排斥物。控制聚合物浓度可以获得或产生悬垂样或末端具功能团的以 PEG 为基础的化合物，允许微丝或马达蛋白特异地黏附在盖玻片或珠子表面。使用基于 PEG 的聚合物来包被的主要的缺点是需要购买价格昂贵的聚合物。我们还发现，染料标记的核苷酸倾向于结合在 PEG 包被的表面，也许是因为核苷酸太小，小到足够渗透到 PEG 层而不造成链的重大变形或去溶剂化。最后，未结合的聚合物必须洗掉以防止由于耗竭效应而引起的珠子聚集（Asakura and Oosawa 1954；Tuinier et al. 2003)。

## 静电作用

电荷介导的蛋白质和底物表面的相互作用也影响了界面能量。典型的蛋白质表面既有正电荷残基也有负电荷残基，使得蛋白质与带电荷的珠子或盖玻片表面的相互作用复杂化。单分子检测缓冲液中带相反电荷的离子分离“屏蔽”了表面电荷，引起静电作用自由能随表面距离呈指数衰减。衰减长度称为德拜屏蔽长度 $\lambda_D$（Debye screening length)，$\lambda_D$ 与带相反电荷的离子浓度的平方根成反比；对于 100 mmol/L 单价盐溶液，$\lambda_D$ 大约是 1 nm（Israelachvili 1992)。因此单纯增加盐浓度会降低静电作用力对于界面能量的作用距离，如果静电作用力是净吸引力的话还可减少电荷引起的吸附。pH（尤其是在蛋白质等电点附近）的变化也可通过引起暴露在外的蛋白质残基的电荷改变而影响相互作用能量。通过改变盐浓度和 pH 来调节表面的相互作用是价格低廉且易于实施

的办法，但是，离子强度或 pH 的全面改变也可影响马达动力。另外，表面附着的不带电荷的聚合物链可用于从表面几个德拜屏蔽长度的范围内通过空间位阻排斥带电荷的蛋白质。由于能同时降低电荷介导的作用和疏水作用，基于 PEG 的包被显得特别有利。

另一种想从静电作用获利的做法是用聚电解质多层复合膜（polyelectrolytemultilayer，PEM）包被。在这种情况下，表面孵育了交替的正电荷和负电荷聚合物层来改变相互作用的势能。通过改变聚合物类型、孵育时间、pH、总层数和最后层的电荷，就有可能创造出一个宽范围的或吸引或排斥的表面（Decher 1997）。PEM 包被用于排斥染料标记的带强负电荷、且常要黏附在封闭蛋白质层和表面 PEG 包被层的核苷酸是一种不错的选择。交替堆积带正电荷的聚乙烯亚胺和带负电荷的聚（丙烯酸）（PAA）层，并以 PAA 层结束，就有可能得到一带强负电荷的表面，能有效排斥染料标记的核苷酸（Kartalov et al. 2003）。使用商品化且价格低廉的聚合物，PEM 包被的表面很容易制作，有些聚合物（如 PAA）还可用于特异黏附微丝或马达蛋白。不同与染料标记的核苷酸，大多数蛋白质有一个异质的表面电荷密度，使它们能够与带电荷的 PEM 包被的表面相互作用，甚至当蛋白质的净电荷和表面电荷相同时也能相互作用（Ladam et al. 2002）。不幸的是，这些相互作用可导致非特异性的、并非实验需要的吸附微丝或马达包被的珠子。

## 蛋白质和核苷酸的表面亲和力特征

表面相互作用是复杂和难以预料的。因此对于特定的应用，需要迅速鉴别感兴趣的蛋白质或核苷酸与各种不同的盖玻片和珠子的亲和力特征，以优化表面处理。为了量化吸附到盖玻片上的染料标记的蛋白质或核苷酸，我们常用 TIRFM 和电子倍增电荷耦合器件（EMCCD）照相机（单分子成像的标准工具）来使表面可视化，并利用雪崩光电二极管计算固定在表面的染料发射的光子来量化染料吸附（图 20-2）。对于用非荧光蛋

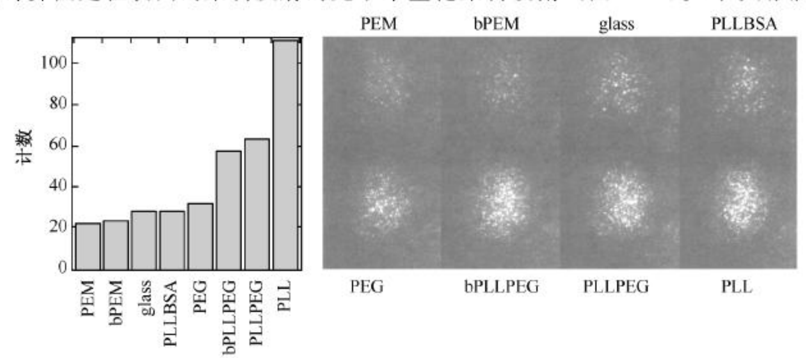



图 20-2 100 nmol/L Cy3-ATP 悬浮在 80 mmol/L PIPES 缓冲液中的斥力，体系中玻璃盖玻片用不同的表面处理方法处理。在进行表面处理前所有表面用等离子清洗仪 2 Torr 在空气中清洗 5 min。PEM 为聚电解质多层复合膜，最后层为 PAA；bPEM 为聚电解质多层复合膜，最后层为生物素化的 PAA；glass 为清洁玻璃；PLLBSA 为多聚赖氨酸处理盖玻片再包被上 10 mg/ml 牛血清白蛋白；PEG 为甲氧基 PEG-NHS 酯共价交联到氨基硅烷化的玻璃；bPLLPEG 为生物素化的 PLL-PEG 共聚物；PLLPEG 为 PLL-PEG 共聚物；PLL 为多聚赖氨酸处理的玻璃。（左）雪崩光电二极管 10 ms 记录到的平均数目。（右）冷 EMCCD 照相机拍下的典型视野（100 ms 积分时间，最大增益，−80℃ ）。

白包被的珠子进行光阱检测，只需要用常规显微镜测量每个视野粘贴的珠子数目来量化吸附（图 20-3）。

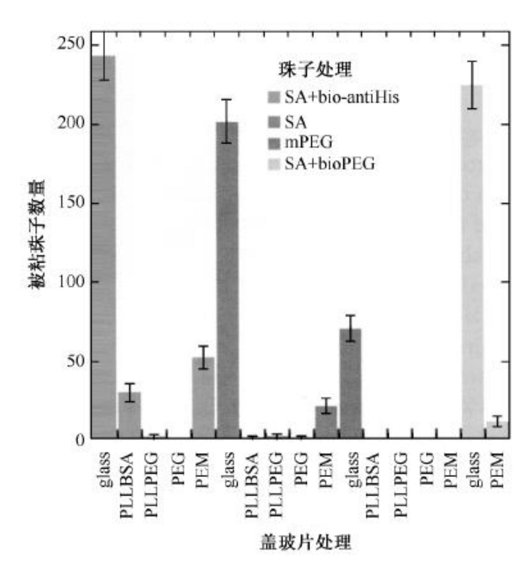



图 20-3　不同珠子、不同表面处理的蛋白质吸附比较。每一柱状代表 40 个视野下被粘住的珠子数量。盖玻片处理：glass 为等离子清洁的玻片；PLLBSA 为经多聚-L-赖氨酸处理并覆一层 10 mg/ml BSA 的玻片；PLLPEG 为覆 PLL-PEG 共聚物的玻片；PEG 为覆有一层共价交联的 PEG-NHS 酯的氨基硅烷化玻片；PEM 为多层聚电解质。珠子处理：SA 为共价交联链霉亲和素的乳胶珠子；SA＋bio-antiHis 为生物素化抗 pentaHis 抗体交联的 SA 珠子；mPEG 为甲氧基-PEG-NHS 酯共价交联的氨基珠子；SA＋bioPEG 为生物素化甲氧 PEG 链孵育的 SA 珠子。尽管在很多情况下封闭蛋白能有效阻断蛋白质吸附，但 PEG 多聚物比传统封闭蛋白更有效。PEM 多层膜不能有效排斥蛋白质吸附；但附加 PEG 链到珠子可以减少珠子黏附。

除了测量蛋白质和核苷酸与底物表面的亲和力，计算珠子活化的结合位点数目也很重要，这有助于确定交联效率和实验故障的分析排除。这可通过与过量的蛋白质孵育，然后离心分离包被了蛋白质的珠子和上清液中未结合的蛋白质，留在上清液中的蛋白质可通过测量内在的荧光或使用传统的蛋白质浓度测定法（如 Bradford 法或 Lowry 法）来定量。

## 技术概览

### 制备清洁的盖玻片和载玻片

市场上“未经清洗的”盖玻片表面覆盖有有机残渣，可在微分干涉相差（DIC）显微镜或荧光显微镜下看到。去除这些污染物对于精确控制蛋白质或聚合物与显微镜流动池的表面的相互作用至关重要。另外，清洗程序会使玻璃表面带上负电荷，便于后续带正电层通过静电作用吸附。虽然对大多数光阱检测应用来说清洗盖玻片已足够，同时清洗载玻片和盖玻片有助于减少单分子荧光实验的背景。

使用不同组合的腐蚀性溶剂（如丙酮、乙酸、氢氧化钾水溶液或乙醇溶液，还有硫酸、过氧化氢混合物的水溶液）可以清除玻璃外层的污染物。表面污染物还可以选用暴露于气体等离子体来清洗。等离子清洗需要购买等离子清洗仪，可以避免使用刺激性化学药品，并能节省时间：等离子清洗大约需 5 min 时间，而化学腐蚀要花上 1 h 或更久。

## 基底-表面黏附

**非特异性黏附**（图 20-4 A～C）

微管和肌动蛋白微丝带静负电荷，从而与带负电荷的盖玻片表面产生静电斥力。尽管有斥力存在，微管偶尔也能直接吸附到清洁的玻璃表面（Block et al., 1990; Carter and Cross 2005）。在大多数情况下，无论是盖玻片表面或细胞骨架丝本身首先要被修饰以增强静电作用或疏水作用的吸附。盖玻片修饰包括氨基硅烷化（Coy et al. 1999）或包被上带正电荷的多肽（如 PLL）（Schnitzer and Block 1997; Block et al. 2003; Mallik et al. 2004）以增强与微管的静电吸引力，表面硅烷化（Svoboda and Block 1994b; Coy et al. 1999; deCastro et al. 1999）或沉积一层硝酸纤维（Syed et al. 2006）来促进玻璃与微管或肌动蛋白微丝的疏水作用。另外，辅助蛋白可以非特异地吸附到盖玻片上，然后这些辅助蛋白与细胞骨架微丝结合，使细胞骨架微丝牢牢地贴到玻璃表面。用此方法，已将微管与能非特异吸附的抗微管蛋白抗血清（Wang et al. 1995）结合，将 F 肌动蛋白微丝在硝酸纤维层与 *N*-乙基马来酰亚胺（NEM）处理的肌球蛋白 II 马达结合（Clemen et al. 2005; Warshaw et al. 2005），将纯化的丝状物通过其微管相关蛋白（MAP）吸附（Vale et al. 1996; Romberg et al. 1998; Sosa et al. 2001; Yildiz et al. 2004）。最后，可能是由于静电和疏水的联合作用，荧光标记的细胞骨架丝往往直接吸附在清洁玻璃表面（Higuchi et al. 1997; Kojima et al. 1997, 2002; Sakakibara et al. 1999; Inoue et al. 2001; Seitz et al. 2002; Uemura et al. 2002; Kawaguchi et al. 2003; Okada et al. 2003; Lakamper and Meyhofer 2005; Ross et al. 2006; Seitz and Surrey 2006; Toba et al. 2006）。

**特异性黏附**（图 20-4 D～F）

微管和肌动蛋白微丝也可以特异地附加到表面上，最常见的方法是通过生物素-亲和素链接。生物素化的 F 肌动蛋白微丝和生物素化的微管可以分别与商品化的未修饰的和生物素化的肌动蛋白单体和微管蛋白异二聚体混合物聚合（Uemura et al. 2004）。聚合的微丝必须从自由亚基中纯化出来（Pardee and Spudich 1982），以防止生物素化亚基迅速扩散到表面，饱和生物素-亲和素结合位点（Valentine et al. 2006）。这些纯化的生物素化的微丝可以直接连接到非特异性吸附的中性链亲和素（Rief et al. 2000; Rock et al. 2000）或通过多价链霉亲和素连接到生物素化表面。有多种可选方案可以产生生物素化的表面：生物素化的 BSA（Uemura et al. 2004; Churchman et al. 2005; Syed et al. 2006）或生物素化的酪蛋白（Nishikawa et al. 2002）可以非特异性地吸附到盖玻片；以生物素基团和 NHS 酯封尾的双效 PEG 可以共价交联到氨基硅烷化玻璃（Rasnik et al. 2004）；易获得生物素化的 PEG-PLL 共聚物（Valentine et al. 2006）；PEM 包被的 PAA 层可通过基于水溶性碳二亚胺（water-soluble-carbodiimide, WSC）

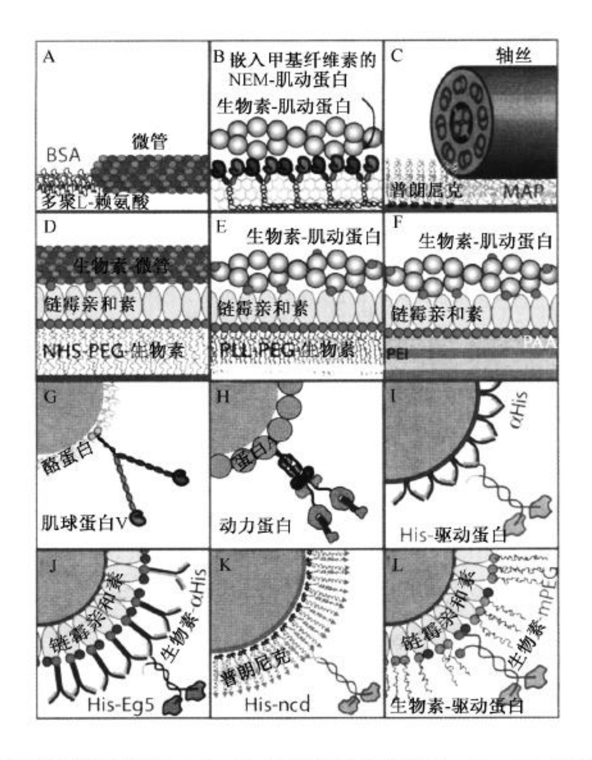



图 20-4　连接细胞骨架微丝到盖玻片（A～F）和马达分子到珠子（G～L）的几种可能附着方案示例。A. 微管非特异地结合到用多聚赖氨酸处理的表面，周围的 BSA 可防止蛋白质进一步吸附。B. 生物素化的肌动蛋白微丝通过 NEM-处理的肌球蛋白分子结合在表面。肌球蛋白嵌入甲基纤维素层。C. 微丝非特异地结合在玻璃上，玻璃用基于 PEG 的共聚物普朗尼克包被。D. 生物素化微管通过链霉亲和素与已经共价结合到玻璃表面双效的生物素化 PEG 链结合。E. 生物素化的肌动蛋白微丝通过链霉亲和素与生物素化的 PLL-PEG 段共聚物结合。F. 生物素化的 F-肌动蛋白微丝通过链霉亲和素与外层为生物素化的 PAA 层的 PEM 表面结合。G. 酪蛋白存在情况下，肌球蛋白 V 马达非特异地与羧化乳胶珠子黏附。H. 蛋白 A 存在情况下，细胞质动力蛋白与羧基乳胶珠子结合。I. His 标记的驱动蛋白与共价交联的 F′-ab 抗体片段结合。J. His 标记的 Eg5 与商品化的链霉亲和素珠子通过生物素化的抗 pentaHis 抗体结合。K. His 标记的 ncd 与硅烷化的硅珠通过经修饰含有镍螯合基团（NTA）的普朗尼克共聚物结合。L. 生物素化的驱动蛋白和生物素化的甲氧基-PEG 链与商品化的链霉亲和素珠子结合。

的化学方法共价交联氨基-聚(环氧乙烷)-生物素寡聚物（可从 Pierce 公司购买 EZ-Link kit 获得）到聚电解质的垂挂羧基基团而被生物素化（Kartalov et al. 2003）。

## 马达蛋白-珠子黏附

**非特异性黏附**（图 20-4 G，H）

像其他基底-表面黏附一样，有许多方案可以实现马达蛋白和珠子的黏附，某些场合下非特异性黏附也是切实可行的方法。从乌贼视叶（Block et al. 1990；Visscher et al. 1999）或牛脑（Higuchi et al. 1997；Nishiyama et al. 2001）中纯化得到的天然驱动

蛋白，在存在和缺失相关轻链情况下重组表达的驱动蛋白重链（Coy et al. 1999），细胞质和鞭毛动力蛋白（Wang et al. 1995；Sakakibara et al. 1999；Kojima et al. 2002；Mallik et al. 2004），以及肌球蛋白 V（Rief et al. 2000；Rock et al. 2000；Uemura et al. 2004；Clemen et al. 2005）都可在封闭蛋白存在下非特异性地结合到硅珠或羧基聚苯乙烯珠上。此外，重组构建的驱动蛋白家庭成员（ncd）的谷胱甘肽-S-转移酶（GST）融合蛋白也能非特异性地吸附到硅烷化的硅珠上（Allersma et al. 1998）。

一些情况下，马达是通过非特异性吸附的结合伴随蛋白来黏附。非特异性与羧基聚苯乙烯珠结合的抗肌球蛋白羧基末端的抗体可以与肌球蛋白特异性结合（Tominaga et al. 2003），把肌动蛋白锚定到预先包被了蛋白质 A 的聚苯乙烯珠上，并交联荧光量子点可以实现可视化（Toba et al. 2006）。一般来说，带负电荷的胶体（如羧基聚苯乙烯或硅球）结合马达蛋白、MAP 和肌动蛋白结合蛋白（actin-binding protein，ABP）比带正电荷的胶体（如氨基聚苯乙烯）要好，而且减少了和带负电荷的细胞骨架丝相互作用的可能性。非特异性的黏附易于操作完成，且不需要对马达蛋白进行广泛的修饰；不过，在光阱中非特异性吸附的蛋白质有可能在施加强作用力下脱落。

**特异性黏附**（图 20-4 I～L）

重组蛋白表达系统产生的可溶的带标签的马达蛋白可以特异黏附在珠子上。这些特异性黏附可将马达定位到指定方位，由于特异结合的结合键特征易于掌握，且键断裂所需要的力较大，所以这种特异性黏附能承受强作用力。所幸的是，大部分肌球蛋白和驱动蛋白家族的马达有相对长的杆状区，且远离催化中心，使得可以通过截断和修饰来引入生物素或抗原表位标记。这种标签也用于通过亲和层析有效地纯化表达的马达蛋白。

在大肠杆菌中表达的马达蛋白可以通过与全长生物素羧基载体蛋白（biotin carboxyl carrier protein，BCCP）（Cronan 1990）或从 BCCP 蛋白到杆状域末尾至少 14 个氨基酸肽（Beckett et al. 1999）结合而生物素化；翻译后修饰把生物素转移到一个特定的赖氨酸残基上。生物素的马来酰亚胺酯也可以共价结合到暴露在表面的半胱氨酸上（Lakamper and Meyhofer 2005），这种偶联通常需要创造仅包含一个暴露在表面的半胱氨酸，即称之为“轻半胱氨酸”的突变蛋白来确保马达结合到已知的方向。一旦被生物素化，马达蛋白就可以附在亲和素、链霉亲和素、中性亲和素包被的珠子上用于光阱检测（Berliner et al. 1994）。这样的珠子可以从 Bangs Laboratories 和 Spherotech 或其他公司购得，或可通过标准的 WSC 交联化学法共价交联亲和素分子到羧基微球上。

还有几种基于抗体相互作用的黏附方案。GFP、FALG、Myc、GST、pentaHistidine（His）（Okada et al. 2003）标签的抗体都已商品化，并可共价交联到珠子上以结合带标签的马达。pentaHistidine 标签需要附加 5 个额外氨基酸，它们可通过生物素化的抗 pentaHistidine 抗体黏附到亲和素珠子上（Asbury et al. 2003；Valentine et al. 2006），或黏附到经化学修饰含镍螯合氨基三乙酸（NTA）的普朗尼克共聚物包被的表面（deCastro et al. 1999）。

对于特殊的黏性蛋白，除了包被盖玻片外还需要在珠子上直接附上 PEG 共聚物。生物素化的蛋白质可以附在亲和素珠子上，然后与一个甲氧基和一个生物素基团收尾的双效 PEG 聚合物孵育。该双效聚合物饱和余下的生物素结合位点，形成一聚合物层抗

表面吸附。同样，对于组氨酸标记的蛋白质，可交联生物素化的抗 pentaHis 抗体和双效 PEG 聚合物的混合物到亲和素珠子上；虽然显著减少了结合容量，但这些珠子仍能抗表面吸附并结合 His 标记的马达蛋白。原理上，一个生物素基团和一个 NHS-酯结尾的双效 PEG 聚合物可以与氨基化的珠子共价交联。随后吸附亲和素分子层到生物素化 PEG 层供以黏附生物素化的马达蛋白。虽然，类似的生物素-亲和素-生物素结合微丝到 PEG 包被的盖玻片作用良好，但是在我们的实验中，PEG 层阻止了亲和素和珠子的高效结合，使得这一交联方案无法实现。

单分子荧光实验需要耦合荧光染料分子或量子点到特定蛋白质。作为与珠子的结合，有时也可以交联荧光染料到马达结合伙伴以避免马达本身的功能变化。对于钙调素携带的肌球蛋白马达，荧光标记的钙调素可以交换内源性钙调素来标记肌球蛋白头部域（Forkey et al. 2003；Yildiz et al. 2003）。同样地，细胞质动力蛋白与动力激活蛋白相关，可以从表达羧基端融合了增强的 GFP（EGFP）的 dynamitin 转基因小鼠（Ross et al. 2006）中纯化获得有 4 个荧光标记的 dynamitin 亚单位。然而大部分蛋白质需要在标记前做一些修饰。大多数马达需要构建一个“轻半胱氨酸”突变体，将表面暴露半胱氨酸突变为其他氨基酸残基，构建截短的只包含一个表面活性半胱氨酸的马达来共价耦合马来酰亚胺酯的荧光染料（Inoue et al. 2001；Sosa et al. 2001；Yildiz et al. 2004；Churchman et al. 2005；Lakamper and Meyhofer 2005）。生物素化的马达蛋白可结合到交联了量子点（Warshaw et al. 2005；Seitz and Surrey 2006）或单荧光团的链霉亲和素上。生物素和 GFP（Nishikawa et al. 2002；Seitz et al. 2002）标签为单分子荧光检测特定蛋白质的运动或光阱检测时交联马达到珠子提供了有利条件。

## 总结

目前开发了大量基于蛋白质和聚合物的表面化学物质来发展单分子检测技术。许多方法稳定且模块化，只需要生物素标记或表位标记的马达蛋白而不依赖于特殊马达的特性。通过混合和匹配各种不同黏附方案，已经有扩展的工具包来解决新型马达蛋白以及细胞骨架蛋白复杂的大分子组装问题。

## 实验方案 1：清洗盖玻片和载玻片

本实验方案描述了盖玻片和载玻片的两种清洗方法——化学试剂法或等离子清洗法。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

乙醇（300 ml，如果用作荧光实验需经 0.2 μm 滤膜过滤）
$H_2O$（0.2 μm 滤膜过滤）（需蒸馏和去离子，Milli-Q 或类似）
氢氧化钾（KOH）（100 g）< !>

#### 设备

烧杯
带盖的容器用于存放玻片
盖玻片或显微载玻片（玻璃）
氮气（过滤，压缩）< !>
烘箱调至约 45℃
等离子清洗仪（Harrick Plasma PDC-001，或类似）（用于等离子清洗法）
聚四氟乙烯或玻璃架（等离子清洗法用玻璃或陶瓷架）
超声波清洗仪，台式（2；Branson 1510 或类似）

### 方法

#### 化学清洗

1. 向装有 300 ml 乙醇的烧杯中加入 100 g KOH，用力搅拌使 KOH 尽量溶解。溶解后溶液会变微棕色。把烧杯放入超声波清洗仪排气 5 min。
   **注意**：这步需要特别当心！
2. 在两个烧杯中加入 300 ml 水，排气 5 min，把第二个装水的烧杯留在超声波清洗仪中。
3. 把盖玻片和载玻片放在聚四氟乙烯或玻璃架中。
4. 把装有盖玻片（或载玻片）的架子放入盛 KOH 的烧杯中，超声处理 5 min。
5. 从 KOH 溶液中拿出架子，在装水的烧杯中上下移动漂洗，每次都要穿过空气-水界面。直到水平稳流下不产生水珠为止。
   洗完 5 个架子后换掉漂洗水。
6. 把玻片架浸没在另一个盛水烧杯中，超声处理 5 min。
7. 在水流下冲洗玻片架 30 s 或更久，注意每个载玻片或盖玻片都要冲洗完全。
8. 若用于光阱检测，需在烘箱（约 45℃）中烘干，并把干净盖玻片存放于密闭容器中。

9. 若用于单分子荧光研究，把玻片架浸在含过滤水的密闭烧杯中不超过 1 周。使用前，在层流箱中用经过滤压缩的氮气真空干燥。

## 等离子清洗

1. 把盖玻片或载玻片放在陶瓷或玻璃架子上。
2. 把玻片架放在等离子清洗仪中央。
3. 打开真空泵。
4. 对于有流量混合器的等离子清洗仪，调节进气量直到箱内压力等于 2 Torr，把玻片暴露在等离子流中 5 min，功率设为“高”。
5. 对于没有流量混合器的等离子清洗仪，把玻片暴露在等离子流中 5 min，功率设为“高”，每隔约 1 min 打开泵阀流入少量空气以增大等离子强度。
6. 若用于光阱检测，把干净盖玻片存放于密闭容器中。
7. 若用于单分子荧光研究，清洗完后立即使用或把玻片架浸在含过滤水的密闭烧杯中不超过 1 周。使用前，在层流箱中用经过滤压缩的氮气真空干燥。

# 实验方案 2：用覆 PLL 的盖玻片进行流动池装配并制备覆 BSA 的盖玻片

本实验方案描述了制备覆 PLL 的盖玻片，用这些盖玻片装配流动池，随后用 BSA 或生物素化 BSA 包被盖玻片的过程。

## 材料

### 试剂

牛血清白蛋白（BSA；Calbiochem）

若需生物素化表面，把 BSA 换成生物素-BSA（Vector Labs）。

乙醇

$H_2O$（0.2 μm 过滤）（需蒸馏和去离子，Milli-Q 或类似）

PEM80（80 mmol/L PIPES pH 6.9，1 mmol/L EGTA，4 mmol/L $MgCl_2$）

多聚 L-赖氨酸（PLL）（Sigma-Aldrich）

### 设备

带盖的容器用于存放玻片

盖玻片（洁净，方形盖玻片用于制备流动室）

双面胶带

过滤器（Millipore，Steriflip）

烘箱调至约 45℃

微量吸头

刀片

载玻片（洁净用于单分子荧光反应）

聚四氟乙烯或玻璃架

## 方法

### 制备覆 PLL 的盖玻片

1. 在 400 ml 乙醇中加入 500 μl PLL。搅拌 2 min。
2. 把盖玻片和载玻片放在聚四氟乙烯或玻璃架上，把架子浸没在 PLL 溶液中。放置 10 min（勿搅动）。
3. 流水冲洗玻片架 30 s 或更久，每片载玻片或盖玻片都要完全漂洗到。
4. 把架子放入烘箱（约 45℃）中烘干，并把干净盖玻片存放于密闭容器中。

   覆 PLL 的盖玻片的黏度常有变化。如果发现微管有波动或者马达包被的珠子黏在盖玻片表面，应按需增减 PLL 的浓度。

## 流动池装配

5. 把两条双面胶相隔 3 mm 粘在载玻片两边，形成一个通道。
6. 用刀片切去多余胶带。
7. 把一方形盖玻片放在载玻片上，使盖玻片的长轴与胶带形成的长轴对齐，盖玻片边缘伸出载玻片，提供交换缓冲液的平台。

   使用洁净的盖玻片，如果接着要包被 BSA，参照步骤 1～步骤 4 制备覆 PLL 的盖玻片。
8. 用塑料吸管顶端压盖玻片表面，排出双面胶中的气泡。
9. 用滤纸或抽滤交换通道缓冲液。

## 制备覆 BSA 的盖玻片

10. 加 20 mg BSA 到 2 ml PEM80 中，缓慢混合使 BSA 溶解。避免起泡。
11. 用 0.2 μm 滤纸过滤 BSA 溶液。
12. 加入约 25 μl BSA 溶液到流动池腔（参照步骤 5～步骤 9 制备流动池，盖玻片经 PLL 处理）。放置＞10 min。
13. 灌入约 100 μl PEM80 以去除过量 BSA。

    根据使用情况来确定 BSA 的用量以防止表面吸附。表面过黏或者不够黏，按需增减 BSA 的浓度。

## 实验方案 3：制备共价交联 PEG 的盖玻片

本实验方案介绍了如何制备共价交联 PEG 的盖玻片，并可修改为制备生物素化 PEG 的盖玻片的实验方案。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

丙酮< !>

$H_2O$（经 0.2 μm 滤过处理）（蒸馏并去离子，Milli-Q 或类似）

甲氧聚乙二醇，末端具有 *N*-羟基琥珀酰亚胺（mPEG-SPA；Nektar）

　　如果需要制备生物素化 PEG 交联的表面，将实验步骤中 mPEG-SPA 聚合物替换成 mPEG-SPA 和 Biotin-PEG-NHS 的混合物（Nektar）。

碳酸氢钠（100 mmol/L，pH 8.7；现配）

Vectabond 溶液（Vector Labs）< !>

#### 设备

盖玻片（洁净的）

双面胶带

氮气（经滤过处理的）< !>

载玻片

### 方法

1. 按以下步骤将盖玻片氨基硅烷化：
   i. 将 7 ml Vectabond 试剂溶解于 350 ml 丙酮中，混合均匀；
   ii. 把盖玻片浸没在纯丙酮中，静置 5 min；
   iii. 转移盖玻片至 Vectabond 溶液中，静置 5 min；
   iv. 用蒸馏水浸没盖玻片，轻轻地清洗 30 s 以去除多余的硅烷；
   v. 在层流箱中，用真空滤过处理的氮气干燥盖玻片约 5 min。
2. 用干燥且氨基硅烷化的盖玻片、载玻片和双面胶带组装流动池（详见实验方案 2）。
3. 用 100 mmol/L 碳酸氢钠溶解 mPEG-SPA 至终浓度 12.5%（*m*/*V*）。
4. 在流动池中加入 25 μl 的 mPEG-SPA 溶液，室温下温浴 2～4 h。
5. 用至少 100 μl 的 100 mmol/L 碳酸氢钠灌流，清洗掉多余的 mPEG-SPA 聚合物。

## 实验方案 4：制备覆 PLL-PEG 的盖玻片

本实验方案介绍了如何制备覆 PLL-PEG 的盖玻片，并可修改为覆生物素化 PLL-PEG 的实验方案。本实验方案改写自 SurfaceSolutionS 提供的实验指南。

### 材料

#### 试剂

缓冲液 A（8 mmol/L 磷酸氢钠，2 mmol/L 磷酸二氢钾，3 mmol/L 氯化钾和 137 mmol/L 氯化钠，pH 7.4；经 0.2 μm 滤过处理）

多聚赖氨酸-接枝-聚乙二醇（poly-L-lysine-graft-polyethylene glycol，PLL-PEG；SurfaceSolutionS）

如果需要制备生物素化 PEG 的表面，将纯 PLL-PEG 用生物素化聚合物代替（SurfaceSolutionS）。

Tris-B 缓冲液（10 mmol/L Tris，10 mmol/L 氯化钠，pH 8.0；经 0.2 μm 滤过处理）

#### 设备

盖玻片（洁净的）

双面胶带

载玻片

### 方法

1. 用洁净的载玻片和盖玻片制备流动池（详见实验方案 2）。
2. 用缓冲液 A 稀释 PLL-PEG 至终浓度 1 mg/ml。

   将 PLL-PEG 溶液小份分装保存在－20℃下待用。
3. 加入步骤 2 配制的约 30 μl PLL-PEG 溶液，放置 30 min（或更长）。
4. 用 100 μl Tris-B 缓冲液灌洗。

# 实验方案 5：制备用于染料标记核苷酸的覆多层 PEI-PAA 的盖玻片

本实验方案改写自 Kartalov 等（2003），介绍了如何制备用于染料标记核苷酸的多层覆盖的盖玻片。本实验方案也包括了制备覆生物素化聚电解质的盖玻片的方法。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

### 试剂

Alconox 洗涤剂< !>

EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride] < !>（用于生物素化）

EZ-link amine-PEO-Biotin 标记试剂盒（Pierce）（用于生物素化）

$H_2O$（经 0.2 μm 滤过处理）（蒸馏并去离子，milli-Q 或类似）

盐酸（HCl）< !>

MES [2-( *N*-morpholino) ethanesulfonic acid] < !>（用于生物素化）

聚丙烯酸（PAA）（Sigma-Aldrich）

聚乙烯亚胺（PEI）（Sigma-Aldrich）< !>

### 设备

烧杯（4 个 1000 ml 玻璃烧杯）

盖玻片（洁净的），装在聚四氟乙烯或玻璃架上

过滤器（0.2 μm）

氮气（经滤过处理的）< !>（用于生物素化）

旋转平台

超声清洗仪（台式）

玻璃皿（4 个，大号）

## 方法

### 制备覆多层 PEI-PAA 的盖玻片

1. 按厂商提供的说明配置 Alconox 溶液。
2. 用 Alconox 洗涤剂在超声清洗仪中清洗烧杯和玻璃皿 15 min。然后用 $H_2O$ 漂洗干净，空气中干燥。
3. 配置聚合物溶液：在 50 ml $H_2O$ 中加入 0.5g PEI，在另外 50 ml $H_2O$ 中加入 0.5 g PAA。室温下缓慢转动 30 min 以上，使之溶解。
4. 待固体溶解后，将各溶液稀释至 2 mg/ml（终浓度），用盐酸调节 pH 至 8.0，并用 0.2 μm 滤膜过滤。

5. 洗净的烧杯一个放 PEI 溶液，一个放 PAA 溶液，另外两个放 $H_2O$（一杯用来漂洗，一杯用来储存）。烧杯分别用玻璃皿盖好。
6. 将盖玻片架浸没在 PEI 溶液中 12 min。然后将其浸没在装满水的烧杯中，轻轻搅拌 30～40 下（不要打破水液分界面），除去多余的聚合物。
7. 再将其浸没在 PAA 溶液中 12 min。按照步骤 6 方法除去多余的聚合物。
8. 重复步骤 6 和步骤 7，沉积全部 4 个聚合物层（两层带负电，两层带正电）。
9. 将制备好的覆聚电解质的盖玻片保存在盛有 $H_2O$ 的烧杯里。
10. 用于单分子荧光时，应当天制备盖玻片。每周配置新的储存液保存在 4℃。每过几个月应清洗烧杯。

## 覆生物素化聚电解质的盖玻片

11. 配置 10 mmol/L MES 溶液 pH 5.5，0.2 μm 过滤除菌。
12. 将覆聚电解质的盖玻片置于层流箱中，用经过滤处理过的氮气干燥。
13. 按实验方案 2 中的方法用干燥的覆聚电解质的盖玻片和洁净的载玻片组装流动池。
14. 配置 DEC 溶液：将 48 mg EDC 溶解于 5 ml MES 至终浓度 50 mmol/L。
15. 立即混合 10 μl EDC 溶液和 10 μl EZ-link 试剂盒中的 Bio-LC-PEO-Amine，将约 20 μl混合物加入每一流动池，室温下温浴至少 30 min。
16. 用至少 100 μl 的 MES 清洗掉多余的交联试剂。

## 实验方案6：制备未经修饰的微管并将它们贴附到PLL表面

本实验方案介绍了如何制备未经修饰的微管并将它们贴附到PLL表面的方法。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

牛血清白蛋白（BSA）
二甲基亚砜（DMSO）< !>
三磷酸鸟苷（GTP；10 mmol/L溶于PEM104；Sigma-Aldrich）
PEM80（80 mmol/L pH 6.9的PIPES，1 mmol/L EGTA，4 mmol/L $MgCl_2$）
PEM104（103.6 mmol/L pH 6.9的PIPES，1.3 mmol/L EGTA，6.3 mmol/L $MgCl_2$）
叠氮钠（65 g/L）< !>
　注意：该试剂剧毒。
STAB缓冲液（见步骤4）
紫杉醇（taxol）< !>（紫杉醇；10 mmol/L溶于DMSO< !>）
无甘油的微管蛋白（10 mg/ml；Cytoskeleton公司）

#### 设备

冰
37℃恒温箱
多聚赖氨酸（PLL）处理过的盖玻片
载玻片
振荡混匀器

### 方法

#### 制备未修饰的微管

1. 把15.4 μl的PEM104和2.0 μl的10 mmol/L GTP混合制成PEM/GTP。
2. 在冰上，将15.2 μl的PEM/GTP和2.2 μl的DMSO结合。振荡后加入4.8 μl 10 mg/ml无甘油的微管蛋白。
3. 37℃温浴1 h使微管聚合。
4. 在微管聚合过程中，混合下述试剂，制备稳定缓冲液（STAB）：
   306.9 μl PEM80
   45 μl 10 mmol/L GTP
   42.3 μl 65 g/L叠氮钠

10.8 μl 10 mmol/L 紫杉醇

45 μl DMSO

5. 温浴 1 h 后，加入 2.0 μl STAB 使微管稳定。

稳定后的微管可以在室温下稳定几个月。

## 将未修饰的微管吸附到 PLL 表面

6. 用一片载玻片和一片 PLL 处理过的盖玻片组装流动池（详见实验方案 2）。
7. 将 1 μl 10 mmol/L 紫杉醇加入 1 ml PEM80 配成 PEMTAX。
8. 用 PEMTAX 将步骤 5 中制备的微管储存溶液稀释 100 倍，然后往每个流动池中加入 25 μl 稀释后的微管，温浴至少 10 min。
9. 以 PEMTAX 为溶剂配置 10 mg/ml BSA。加入 100 μl 该溶液洗脱没有结合的微管，并使表面覆上一层封闭蛋白。使用前温浴至少 10 min。

## 实验方案 7：制备生物素化的微管并将它们吸附到生物素化的表面

本实验方案介绍了如何制备生物素化的微管（bMT）和将它们吸附到生物素化的表面的方法。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜!＞的材料。

试剂

生物素（100 mmol/L 溶解于 DMSO＜!＞中）
生物素化的表面：以下任意一种均可：
  生物素化的 BSA（详见实验方案 2）
  生物素化的 PEG（详见实验方案 3）
  生物素化的聚合电解质层（PEM）（详见实验方案 5）
生物素化的微管蛋白（冻干粉；Cytoskeleton 公司）
二甲基亚砜（DMSO）＜!＞
三磷酸鸟苷（GTP；10 mmol/L 溶于 PEM104 中；Sigma-Aldrich）
PEM80（80 mmol/L pH 6.9 的 PIPES，1 mmol/L EGTA，4 mmol/L $MgCl_2$）
PEM104（103.6 mmol/L pH 6.9 的 PIPES，1.3 mmol/L EGTA，6.3 mmol/L $MgCl_2$）
叠氮钠（65g/L）＜!＞
  注意：该试剂剧毒。
STAB 缓冲液（见步骤 6）
链霉亲和素（Prozyme）
蔗糖
紫杉醇＜!＞（Paclitaxel；10 mmol/L 溶于 DMSO＜!＞中）
Tris-B 缓冲液（10 mmol/L Tris，10 mmol/L pH 8.0 的 NaCl；经 0.2 μm 滤过处理）
无甘油的微管蛋白（10 mg/ml；Cytoskeleton 公司）

设备

离心管
冰
37℃恒温箱
超速离心机（Beckman Coulter Optima，带有 MLS-50 转头，或类似）
振荡混匀仪

## 方法

### 制备 bMT

1. 把 2.47 ml 的 PEM104 和 0.32 ml 的 10 mmol/L GTP 混合制成 PEM/GTP。
2. 在冰上，将 20 μg 冻干的生物素化微管蛋白溶于 4 μl 冷的 PEM/GTP 中，使终浓度为 5 mg/ml。
3. 在冰上，将 3.8 μl 5 mg/ml 生物素化的微管和 15.4 μl 10 mg/ml 无甘油的微管蛋白结合。
4. 将 60.8 μl PEM/GTP 和 8.8 μl DMSO 振荡混合。加入 19.2μl 微管混合物并混合均匀。
5. 37℃温浴 1 h，使 bMT 聚合。
6. 聚合过程中，将以下试剂混合，制备稳定缓冲液（STAB）：

| | |
|---|---|
| 306.9 μl | PEM80 |
| 45 μl | 10 mmol/L GTP |
| 42.3 μl | 65 g/L 叠氮钠 |
| 10.8 μl | 10 mmol/L 紫杉醇 |
| 45 μl | DMSO |

7. 聚合完毕后，加入 2 μl STAB 使聚合的 bMT 混合物稳定形成 bMT。室温下储存 bMT 过夜。
8. 制备蔗糖垫（2 ml PEM/GTP，220 μl DMSO，200 μl STAB，400 mg 蔗糖）。将聚合的 bMT 铺在蔗糖垫上。用 MLS-50 转头于 30℃，26 000 *g* 离心 20min。
9. 弃上清，将沉淀用 100 μl STAB 重悬。
10. 室温下保存 bMT（如果需要可以保存数周）。在光阱检测实验前临时稀释 50～100 倍。

### 将 bMT 贴附到生物素化的表面

11. 用生物素化的表面制作流动池（见实验方案 2）。用 100 μl Tris-B 缓冲液洗脱没有结合的生物素化试剂。
12. 以 Tris-B 缓冲液为溶剂配置 0.2 mg/ml 的链霉亲和素。加入 30 μl 该溶液，温浴至少 10 min。
13. 用 100 μl Tris-B 缓冲液洗脱未结合的链霉亲和素。
14. 将 1 μl 10 mmol/L 的紫杉醇加入 1 ml PEM80 中，配置成 PEMTAX。加入 100 μl PEMTAX 来交换制备 bMT 时的缓冲液。
15. 用 PEMTAX 把步骤 10 中配置的 bMT 储存溶液稀释 100 倍。在每个流动池中加入 25 μl 稀释的 bMT。温浴至少 30 min。
16. 在 1 ml PEMTAX 中加入 20 μl 100 mmol/L 的生物素。加入 100 μl 生物素-PEMTAX 洗脱多余的 bMT；封闭结合于表面的链霉亲和素上所有余下的生物素结合位点。温浴 5 min 用于后续实验。

# 实验方案 8：用生物素/亲和素蛋白结合制备 penta-His 抗体包被的珠子

本实验方案介绍了用生物素/亲和素蛋白结合来制备 penta-His 抗体包被的珠子的方法。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜！＞的材料。

### 试剂

生物素（100 mmol/L 溶解于 DMSO＜！＞中）（可选；详见步骤 7 iii）
生物素交联的 penta-His 抗体（QIAGEN）
生物素化的甲氧基聚乙二醇（mPEG）（2 mg 溶于 0.5 ml PEM80 中，Nektar）（可选；详见步骤 7 iii）
$H_2O$（经 0.2 μm 滤过处理）（蒸馏并去离子，milli-Q 或类似）
PEM80（80 mmol/L pH 6.9 的 PIPES，1 mmol/L EGTA，4 mmol/L $MgCl_2$）
磷酸钠缓冲液（SPBT；100 mmol/L，pH 7.5，含 0.1% Tween 20）
链霉亲和素包被的聚合胶质珠子（Spherotech，0.44 μm，或类似）

### 设备

台式小型离心机
冰
微量离心管
旋转平台
超声波粉碎仪（超声匀浆仪），带有微量杯型破碎头

## 方法

1. 往微量离心管中加入 70 μl PEM80 和 10 μl 链霉亲和素包被的珠子，混匀。
2. 在超声波粉碎仪中加入 $H_2O$ 和冰（用来防止温度过热导致的蛋白质变性）。将离心管底部有珠子混合物部分浸没在超声波发生器杯中。40%、无脉冲超声 2 min（如果珠子聚集成块状，延长时间）。
3. 加入 20 μl 生物素交联的 penta-His 抗体溶液并混合均匀。
4. 室温下轻柔地旋转 1 h。
5. 清洗 5 次以去除多余的抗体。每洗一次，将珠子混合物 4℃，14 000 r/min 离心 6 min。弃上清液。并用相同体积的 SBPT 重悬珠子。用力吹打（避免产生泡沫）刮擦离心管底部使珠子充分重悬。
6. 将珠子保存于 4℃ 环境下的旋转仪上。

珠子通常具有 3 个月的活性，直到抗体包被的珠子结合组氨酸标记的马达蛋白的效率降低。

7. 当用于光阱检测时，进行以下处理。

   i. 用超声波处理抗体包被的珠子，并稀释大约 50 倍。

   ii. 将珠子与组氨酸标记的马达蛋白温浴 4～12 h。将马达蛋白浓度充分稀释，以保证平均每个珠子只携带一个马达蛋白 [更详细的步骤，请查阅 Svoboda 和 Block (1994b)]。

   iii. 为防止生物素介导的生物素-亲和素表面的贴附，在温浴过程中，每 200 μl 珠子-马达混合物中加入 10 μl 生物素来饱和生物素结合的空位点。对于一些很“黏”的蛋白质，可以替换成 10 μl 生物素化的 mPEG。

# 实验方案 9：制备共价结合的抗体包被的珠子

本实验方案介绍了基于 EDC 交联的化学方法来制备 penta-His 抗体包被的尾端为羧基的聚苯乙烯小球。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

尾端为羧基的聚苯乙烯小球［如 Bangs Laboratories 生产的 0.51 μm P(S/V-COOH)］
EDC <!>
甘氨酸
MES 缓冲液（100 mmol/L，pH 5.5）<!>
penta-His 鼠单克隆抗体（QIAGEN）
磷酸钠缓冲液（100 mmol/L，pH 7.5）
NHS（sulfo-*N*-hydroxysuccinimide）<!>
Tween 20

### 设备

台式离心机
冰
旋转平台
超声波粉碎仪（超声波匀浆仪），带有微量杯型破碎头

## 方法

1. 在超声波粉碎仪中加入 $H_2O$ 和冰。取厂商提供的 200 μl 珠子储存溶液超声处理 2 min（如果珠子聚集成块，可以适当延长时间）。
2. 在 100 μg 抗体中加入 500 μl MES 缓冲液。
3. 将 20 mg NHS、1.3 ml MES 缓冲液和 500 μl 抗体溶液混合。
4. 加入超声波处理过的珠子溶液并上下颠倒管子充分混匀。
5. 在珠子溶液中加入 50 mg 固体 EDC 并上下颠倒管子充分混匀。
   对于通常使用的珠子，这相当于加入大约 400 倍摩尔的 EDC 来激活结合在表面的羧基基团。
6. 室温下旋转温浴过夜。
7. 用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.5）配置 1 mol/L 甘氨酸溶液（储存液稀释10 倍）。

8. 在珠子混合物中加入 500 μl 1 mol/L 甘氨酸溶液温浴 15 min 来终止没有反应的羧基基团。
9. 将珠子等分成 5 份，每份 500 μl。
10. 清洗 5 次以去除多余的抗体。每洗一次，将珠子混合物于 4℃下 14 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，用 200 μl 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液重悬珠子，再加入 0.1%的 Tween 20，并上下吹吸。
11. 最后一次洗涤完毕后，多加入 300 μl 磷酸钠缓冲液使最终的体积达到 500 μl。
12. 将珠子保存于 4℃环境下的旋转仪上。

   珠子通常有 6 个月的活性。

   更多关于基于 EDC 交联的化学方法，参见 Hermanson (1996)。

## 致谢

本工作得到了一些基金的资助：S. M. B 得到了美国国立卫生院的基金资助，M. T. V 得到了 Burroughs Wellcome 基金给予的支持，P. M. F. 得到了国家科学基金的博士奖学金和 Lieberman 奖学金。我们要特别感谢 Gary Skinner、Andrea Kurtz 和 Margaret Gardel 对于共聚物包被技术的建议和 Block 实验室成员的有益讨论。

## 参考文献

Allersma M.W., Gittes F., deCastro M.J., Stewart R.J., and Schmidt C.F. 1998. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.* **74:** 1074–1085.

Altman D., Sweeney H.L., and Spudich J.A. 2004. The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* **116:** 737–749.

Amiji M. and Park K. 1992. Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers. *Biomaterials* **13:** 682–692.

Asakura S. and Oosawa F. 1954. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *J. Chem. Phys.* **22:** 1255–1256.

Asbury C.L., Fehr A.N., and Block S.M. 2003. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science* **302:** 2130–2134.

Beckett D., Kovaleva E., and Schatz P.J. 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* **8:** 921–929.

Benesch J., Svedhem S., Svensson S.C.T., Valiokas R., Liedberg B., and Tengvall P. 2001. Protein adsorption to oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers: Experiments with fibrinogen, heparinized plasma, and serum. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12:** 581–597.

Berliner E., Mahtani H.K., Karki S., Chu L.F., Cronan J.E., Jr., and Gelles J. 1994. Microtubule movement by a biotinated kinesin bound to streptavidin-coated surface. *J. Biol. Chem.* **269:** 8610–8615.

Bhadra D., Bhadra S., Jain P., and Jain N.K. 2002. Pegnology: A review of PEG-ylated systems. *Pharmazie* **57:** 5–29.

Block S.M., Goldstein L.S., and Schnapp B.J. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348:** 348–352.

Block S.M., Asbury C.L., Shaevitz J.W., and Lang M.J. 2003. Probing the kinesin reaction cycle with a 2D optical force clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 2351–2356.

Carter N.J. and Cross R.A. 2005. Mechanics of the kinesin step. *Nature* **435:** 308–312.

Churchman L.S., Okten Z., Rock R.S., Dawson J.F., and Spudich J.A. 2005. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 1419–1423.

Clemen A.E., Vilfan M., Jaud J., Zhang J., Barmann M., and Rief M. 2005. Force-dependent stepping kinetics of myosin-V. *Biophys. J.* **88:** 4402–4410.

Cole D.G., Saxton W.M., Sheehan K.B., and Scholey J.M. 1994. A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.* **269:** 22913–22916.

Coy D.L., Wagenbach M., and Howard J. 1999. Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J. Biol. Chem.* **274:** 3667–3671.

Cronan J.E., Jr. 1990. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J. Biol. Chem.* **265:** 10327–10333.

deCastro M.J., Ho C.H., and Stewart R.J. 1999. Motility of dimeric ncd on a metal-chelating surfactant: Evidence that ncd is not processive. *Biochemistry* **38:** 5076–5081.

deCastro M.J., Fondecave R.M., Clarke L.A., Schmidt C.F., and Stewart R.J. 2000. Working strokes by single molecules of the kinesin-related microtubule motor ncd. *Nat. Cell Biol.* **2:** 724–729.

Decher G. 1997. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277:** 1232–1237.

Endow S.A. and Waligora K.W. 1998. Determinants of kinesin

motor polarity. *Science* **281:** 1200–1202.

Finer J.T., Simmons R.M., and Spudich J.A. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368:** 113–119.

Forkey J.N., Quinlan M.E., Shaw M.A., Corrie J.E., and Goldman Y.E. 2003. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature* **422:** 399–404.

Guilford W.H., Dupuis D.E., Kennedy G., Wu J., Patlak J.B., and Warshaw D.M. 1997. Smooth muscle and skeletal muscle myosins produce similar unitary forces and displacements in the laser trap. *Biophys. J.* **72:** 1006–1021.

Hermanson G.T. 1996. *Bioconjugate techniques.* Academic Press, San Diego.

Higuchi H., Muto E., Inoue Y., and Yanagida T. 1997. Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 4395–4400.

Inoue Y., Iwane A.H., Miyai T., Muto E., and Yanagida T. 2001. Motility of single one-headed kinesin molecules along microtubules. *Biophys. J.* **81:** 2838–2850.

Ishijima A., Kojima H., Funatsu T., Tokunaga M., Higuchi H., Tanaka H., and Yanagida T. 1998. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* **92:** 161–171.

Israelachvili J. 1992. *Intermolecular and surface forces.* Academic Press, London.

Kapitein L.C., Peterman E.J., Kwok B.H., Kim J.H., Kapoor T.M., and Schmidt C.F. 2005. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **435:** 114–118.

Kartalov E.P., Unger M.A., and Quake S.R. 2003. Polyelectrolyte surface interface for single-molecule fluorescence studies of DNA polymerase. *BioTechniques* **34:** 505–510.

Kawaguchi K., Uemura S., and Ishiwata S. 2003. Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics. *Biophys. J.* **84:** 1103–1113.

Klopfenstein D.R., Tomishige M., Stuurman N., and Vale R.D. 2002. Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* **109:** 347–358.

Kojima H., Kikumoto M., Sakakibara H., and Oiwa K. 2002. Mechanical properties of a single-headed processive motor, inner-arm dynein subspecies-c of *Chlamydomonas* studied at the single molecule level. *J. Biol. Physics* **28:** 335–345.

Kojima H., Muto E., Higuchi H., and Yanagida T. 1997. Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* **73:** 2012–2022.

Kon T., Nishiura M., Ohkura R., Toyoshima Y.Y., and Sutoh K. 2004. Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* **43:** 11266–11274.

Kull F.J., Sablin E.P., Lau R., Fletterick R.J., and Vale R.D. 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380:** 550–555.

Kuo S.C. and Sheetz M.P. 1993. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science* **260:** 232–234.

Ladam G., Schaaf P., Decher G., Voegel J., and Cuisinier F.J. 2002. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Biomol. Eng.* **19:** 273–280.

Lakamper S. and Meyhofer E. 2005. The E-hook of tubulin interacts with kinesin's head to increase processivity and speed. *Biophys. J.* **89:** 3223–3234.

Mallik R., Carter B.C., Lex S.A., King S.J., and Gross S.P. 2004. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* **427:** 649–652.

Marx A., Muller J., and Mandelkow E. 2005. The structure of microtubule motor proteins. *Adv. Protein Chem.* **71:** 299–344.

Mehta A.D., Rock R.S., Rief M., Spudich J.A., Mooseker M.S., and Cheney R.E. 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400:** 590–593.

Neuman K.C. and Block S.M. 2004. Optical trapping. *Rev. Sci. Instrum.* **75:** 2787–2809.

Nishikawa S., Homma K., Komori Y., Iwaki M., Wazawa T., Hikikoshi Iwane A., Saito J., Ikebe R., Katayama E., Yanagida T., and Ikebe M. 2002. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290:** 311–317.

Nishiyama M., Muto E., Inoue Y., Yanagida T., and Higuchi H. 2001. Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nat. Cell Biol.* **3:** 425–428.

Okada Y., Higuchi H., and Hirokawa N. 2003. Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* **424:** 574–577.

Okada Y., Yamazaki H., Sekine-Aizawa Y., and Hirokawa N. 1995. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81:** 769–780.

Okten Z., Churchman L.S., Rock R.S., and Spudich J.A. 2004. Myosin VI walks hand-over-hand along actin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 884–887.

Pardee J.D. and Spudich J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* **85:** 164–181.

Peterman E.J., Sosa H., and Moerner W.E. 2004. Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of biomolecular motors. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **55:** 79–96.

Prime K.L. and Whitesides G.M. 1991. Self-assembled organic monolayers: Model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science* **252:** 1164–1167.

Purcell T.J., Sweeney H.L., and Spudich J.A. 2005. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 13873–13878.

Purcell T.J., Morris C., Spudich J.A., and Sweeney H.L. 2002. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 14159–14164.

Rasnik I., Myong S., Cheng W., Lohman T.M., and Ha T. 2004. DNA-binding orientation and domain conformation of the *E. coli* Rep helicase monomer bound to a partial duplex junction: Single-molecule studies of fluorescently labeled enzymes. *J. Mol. Biol.* **336:** 395–408.

Rief M., Rock R.S., Mehta A.D., Mooseker M.S., Cheney R.E., and Spudich J.A. 2000. Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9482–9486.

Rock R.S., Rief M., Mehta A.D., and Spudich J.A. 2000. In vitro assays of processive myosin motors. *Methods* **22:** 373–381.

Rock R.S., Ramamurthy B., Dunn A.R., Beccafico S., Rami B.R., Morris C., Spink B.J., Franzini-Armstrong C., Spudich J.A., and Sweeney H.L. 2005. A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI. *Mol. Cell* **17:** 603–609.

Romberg L. and Vale R.D. 1993. Chemomechanical cycle of kinesin differs from that of myosin. *Nature* **361:** 168–170.

Romberg L., Pierce D.W., and Vale R.D. 1998. Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J. Cell Biol.* **140:** 1407–1416.

Ross J.L., Wallace K., Shuman H., Goldman Y.E., and Holzbaur E.L. 2006. Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. *Nat. Cell Biol.* **8:** 562–570.

Russel W.B., Saville D.A., and Schowalter W.R. 1989. *Colloidal dispersions.* Cambridge University Press, Cambridge.

Sakakibara H., Kojima H., Sakai Y., Katayama E., and Oiwa K. 1999. Inner-arm dynein c of *Chlamydomonas* flagella is a single-headed processive motor. *Nature* **400:** 586–590.

Schief W.R., Clark R.H., Crevenna A.H., and Howard J. 2004. Inhibition of kinesin motility by ADP and phosphate supports a hand-over-hand mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 1183–1188.

Schnitzer M.J. and Block S.M. 1995. Statistical kinetics of processive enzymes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **60:** 793–802.

———. 1997. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* **388:** 386–390.

Seitz A. and Surrey T. 2006. Processive movement of single kinesins on crowded microtubules visualized using quantum dots. *EMBO J.* **25:** 267–277.

Seitz A., Kojima H., Oiwa K., Mandelkow E.M., Song Y.H., and

Mandelkow E. 2002. Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J.* **21:** 4896–4905.

Shaevitz J.W., Block S.M., and Schnitzer M.J. 2005. Statistical kinetics of macromolecular dynamics. *Biophys. J.* **89:** 2277–2285.

Sosa H., Peterman E.J., Moerner W.E., and Goldstein L.S. 2001. ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **8:** 540–544.

Svoboda K. and Block S.M. 1994a. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23:** 247–285.

———. 1994b. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77:** 773–784.

Svoboda K., Schmidt C.F., Schnapp B.J., and Block S.M. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365:** 721–727.

Syed S., Snyder G.E., Franzini-Armstrong C., Selvin P.R., and Goldman Y.E. 2006. Adaptability of myosin V studied by simultaneous detection of position and orientation. *EMBO J.* **25:** 1795–1803.

Takahashi Y., Edamatsu M., and Toyoshima Y.Y. 2004. Multiple ATP-hydrolyzing sites that potentially function in cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 12865–12869.

Toba S., Watanabe T.M., Yamaguchi-Okimoto L., Toyoshima Y.Y., and Higuchi H. 2006. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 5741–5745.

Tominaga M., Kojima H., Yokota E., Orii H., Nakamori R., Katayama E., Anson M., Shimmen T., and Oiwa K. 2003. Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *EMBO J.* **22:** 1263–1272.

Tuinier R., Rieger J., and de Kruif C.G. 2003. Depletion-induced phase separation in colloid-polymer mixtures. *Adv. Colloid Interface Sci.* **103:** 1–31.

Uemura S., Higuchi H., Olivares A.O., De La Cruz E.M., and Ishiwata S. 2004. Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11:** 877–883.

Uemura S., Kawaguchi K., Yajima J., Edamatsu M., Toyoshima Y.Y., and Ishiwata S. 2002. Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 5977–5981.

Uyeda T.Q., Abramson P.D., and Spudich J.A. 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 4459–4464.

Valagao Amadeu do Serro A.P., Fernandes A.C., de Jesus Vieira Saramago B., and Norde W. 1999. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J. Biomed. Mater. Res.* **46:** 376–381.

Vale R.D., Funatsu T., Pierce D.W., Romberg L., Harada Y., and Yanagida T. 1996. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380:** 451–453.

Valentine M.T., Fordyce P.M., Krzysiak T.C., Gilbert S.P., and Block S.M. 2006. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. *Nat. Cell Biol.* **8:** 470–476.

VandeVondele S., Voros J., and Hubbell J.A. 2003. RGD-grafted poly-L-lysine-*graft*-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* **82:** 784–790.

Veigel C., Schmitz S., Wang F., and Sellers J.R. 2005. Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat. Cell Biol.* **7:** 861–869.

Visscher K. and Block S.M. 1998. Versatile optical traps with feedback control. *Methods Enzymol.* **298:** 460–489.

Visscher K., Schnitzer M.J., and Block S.M. 1999. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* **400:** 184–189.

Walker R.A., Salmon E.D., and Endow S.A. 1990. The *Drosophila* claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature* **347:** 780–782.

Wang Z., Khan S., and Sheetz M.P. 1995. Single cytoplasmic dynein molecule movements: Characterization and comparison with kinesin. *Biophys. J.* **69:** 2011–2023.

Warshaw D.M., Kennedy G.G., Work S.S., Krementsova E.B., Beck S., and Trybus K.M. 2005. Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity. *Biophys. J.* **88:** L30–32.

Wazawa T. and Ueda M. 2005. Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **95:** 77–106.

Wells A.L., Lin A.W., Chen L.Q., Safer D., Cain S.M., Hasson T., Carragher B.O., Milligan R.A., and Sweeney H.L. 1999. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401:** 505–508.

Yildiz A., Tomishige M., Vale R.D., and Selvin P.R. 2004. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303:** 676–678.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., and Selvin P.R. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300:** 2061–2065.

Zhang Y. and Hancock W.O. 2004. The two motor domains of KIF3A/B coordinate for processive motility and move at different speeds. *Biophys. J.* **87:** 1795–1804.

（朱丽君　译）

# 第21章　液流牵张力分析法用于核酸-蛋白质相互作用的单分子研究

**Charles M. Schroeder　Paul C. Blainey　Sangjin Kim　X. Sunney Xie**

Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University,
Cambridge, Massachusetts 02138

## 摘要

在单分子水平研究DNA和蛋白质相互作用时，液流牵张力分析法（hydrodynamic flow-stretching assay）是一种十分便捷的方法。在该分析方法中，生物大分子，如DNA等的一端被固定在玻片上。而大分子的另一端可自由运动或被拴系在某个珠子上，同时大分子周围的缓冲液在流动中引起的液体摩擦力将大分子牵拉伸展开来。这种分析方法可以用来研究核酸酶（前进型的或非前进型的）、结合DNA的蛋白质间的相互作用（特异的和非特异的），以及DNA和RNA内的蛋白质相互作用。该方法比起别的方法来说具有以下的优点：相对简单的实验设计、低成本的实验仪器、具有高数据通量的多路复用技术能力、操作容易等。在本章，我们将会讨论这种分析方法的潜在应用，在给出详细的例子说明后，还附有详尽的实验步骤。

## 概述

单分子技术的发展开启了分子水平上研究生命过程的新形势。在分子水平对生命系统基础成分的研究在我们面前揭开了生命体生化机制的宝库。单分子技术的发展使我们对生化反应实时观察的梦想成为现实，从而向人们展示了复杂生物系统的丰富的动力学行为。此外，在单分子水平上对生化反应的观察使我们摆脱了对系统集成平均的测量和只能获得平均测量结果的局限。

在本章，我们将叙述在单分子水平上研究DNA与蛋白质相互作用的液流牵张力分析方法。该分析方法能被应用于多种单分子研究，其中包括核酸酶研究（前进型或非前进型的）、结合DNA的蛋白质间的相互作用（特异和非特异的），以及核酸依赖的蛋白质间相互作用研究等。在讨论中，我们将会举例并给出详尽的实验步骤来帮助大家在实验室里实施该方法。

迄今已经发展了好几种体外操作生物大分子的单分子技术。首先我们将对现已存在的单分子技术进行一个概述，从而能在相互比较中得到各自的优点。在本章中，我们仅仅粗略地对各种已存在的技术进行概述，如果想了解更多细节，可以参考另一篇有关各种单分子技术的全面综述（Bustamante et al. 2000）。表21-1总结了操作单个生物分子的实验技术，该表的内容集中在研究生物大分子（DNA/RNA/蛋白质）机制、核酸酶、DNA与蛋白质相互作用上。总体而言，由流体力场、磁场和光场产生的力场可以用来直接操作固定在生物分子自身或某一目的片段上的探针。与上述外部力场不同，原子力

显微技术和其他的微操作方法可以在分子本身上施加作用从而使我们能够直接探测处于观察中的分子。

**表 21-1 研究 DNA 与蛋白质间相互作用的三种单分子操作技术概括表**

| 操作方法 | 工作原理 | 优点 | 应用范围 |
|---|---|---|---|
| 流体力场 | 流动的液体对固定在生物分子上的微粒或分子本身施加作用力 | 可以获得多通路的数据；实验中缓冲液的交换快速；操作方法简单；低成本的实验仪器 | 酶学；λ外切核酸酶(van Oijen et al. 2003)、T7复制(lee et al. 2006)<br>DNA动力学；熵弹性(Smith et al. 1992)<br>高分子物理学(Schroeder et al. 2003) |
| 磁场力 | 磁场梯度作用于磁性颗粒上，通常磁性颗粒固定在生物分子上 | 磁场力只作用于磁性物质上；核酸模板的扭转控制 | DNA动力学；DNA弹性力学(Strick et al. 1996；Gore et al. 2006)<br>酶学和DNA拓扑学；拓扑异构酶II(Srick et al. 2000)<br>酶学-DNA复制；T7 DNA聚合酶和克伦诺片段(Maier et al. 2000) |
| 光学捕获 | 聚焦激光束对介质中微粒的光阱力 | 对微粒操作上的灵敏控制；选择性地施加作用力；极高的空间分辨率 | 酶学；RNA聚合酶(Abbondanzieri et al. 2005)<br>蛋白质动力学；去折叠/重折叠核糖核酸酶H(Cecconi et al. 2005) |

基于流体力学的分析（hydrodynamic flow-based assay）为在单分子水平研究生化现象提供了许多方便。首先，人们得益于该方法带来的较为简单的实验设计和浅显易懂的操作步骤。对探针的操纵仅仅需要流体源的存在（如一个注水泵）。相比起需要在样本图像内有一个聚焦激光束的光学捕获技术来说，基于流体的测试技术所需的实验仪器则简单得多且成本低廉。然而值得我们注意的是，液流分析所获得的空间分辨率要比光学捕获技术低（Abbondanzieri et al. 2005）。此外，基于流体的分析技术能获得多通路的数据，从而拥有较高数据通量。在实验观察的单个显微镜视场下，能实时观测多达数百个一端被固定的分子。当某一实验步骤极为低效的时候（如组装多蛋白酶复合物的时候），多通路数据获得能力就显得十分重要。最后要指出的是，在该分析中，由流体为生物大分子探针提供了模板力，因此实验过程里对缓冲液的改变是十分方便和快速的。当然，我们能想象到并完成比上述介绍的基本情形更复杂的液流小室（flow cell）设计。微流体技术的适应性扩展了液流牵张力分析法的应用范围。

## 一般性讨论

我们在这里讨论流体牵张力分析的两种特殊情形。在第一种操作模式下（模式 I），探针微粒与生物大分子的非表面固定端相连。在下面的讨论中，DNA 被默认为模式生物大分子，在更普遍的意义上，核酸、天然生物大分子诸如蛋白质和合成的聚合物链也都可以作为分析的对象。在分析的第一种模式下，分子模板被流体加在探针（如微米尺度的珠）上的力牵引起来。在绝大多数情况下，作用于 DNA 的分子（如蛋白质和酶）的尺寸要远远小于微米大小的探针，因此，和探针的运动不同，在表面附近运动的蛋白

质主要受控于布朗运动（见插注 1）。在第二种操作模式下（模式 II），生物大分子（如 DNA）仍然在表面处被固定住，但实验中却不需要在远离表面的另一端连上探针。拴系在表面的 DNA 分子被直接作用于其上的流体力给牵拉起来。在该情形下，生物分子最初可能是不能观测的。然而，我们能够实时获得荧光标记的结合 DNA 蛋白的酶活动。此外，在缺少微米尺度的探针的情况下，用全内反射显微镜获取荧光分子图像时，由流体牵拉的 DNA 分子（10～100＋ kb 大小）被包含在离液流小室内壁表面约100 nm 处产生的隐失波内。

**插注 1. 液流牵张力分析法中对流和扩散力的相对重要性**

在流体牵张力分析中，生物大分子和探针的动态运动过程是对流和扩散力复杂的交互作用的结果。我们可以使用皮克列数（Peclet number）作为对流作用和扩散运动相互作用的定量描述（Pe）

$$\mathrm{Pe} = \frac{UL}{D} \tag{B1}$$

皮克列数是由特征参数长度 $L$、速度 $U$ 和扩散系数 $D$ 构成的基态簇守恒方程计算出的一个无量纲参数（Dean 1998）。特别要指出的是，皮克列数是对流作用与扩散作用的比值（注意到 $D/L$ 的单位和速度的单位相同）。如果 Pe＞1，那么流体的对流作用对其中的物体运动起支配作用，又如 Pe＜1，那么流体的扩散运动发挥主要作用。扩散系数能用 stokes-Einstein 关系重新表达为

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \tag{B2}$$

式中，$R$ 为物体的半径；$\eta$ 为溶液的流动速度；$k$ 为玻耳兹曼常数；$T$ 为绝对温度。此外，在表面附近，流体平行于表面方向的速度 $U$ 随着表面法线方向高度 $y$ 的增大而线性增加。因此有 $U = cy$，$c$ 表示 $y$ 上的一个恒定的速度梯度参数。将关系式 B2 和速度梯度代入 B1，则皮克列数表达式变为：

$$\mathrm{Pe} = \frac{R^2\eta(cy)}{kT} \tag{B3}$$

我们首先考察探针珠子的皮克列数。通常使用的珠子的半径 $R$ 是 1.4 μm，溶液运动速度 $\eta$=1 cP（厘泊，1 cP＝$10^{-3}$ Pa・s），而实验温度大约是 295 K。使用稀土磁铁产生的磁场将磁性小珠托离表面使珠子的中心和表面相距大约 2 μm。在容积流率为 1 ml/h 下，速度梯度 $c$ 在液流小室的横截面积为宽 3 mm×高 100 μm 的状况下是 20/s。由以上值得到 $\mathrm{Pe}^{\mathrm{bead}}$＝20，说明珠子的运动主要受对流作用的影响。具有转动半径 $R$=5 nm 的蛋白质在相同高度时的 $\mathrm{Pe}^{\mathrm{protein}}$＝0.000 25。因此在通常情形的容积流率和状态下，蛋白质和核酸酶主要受扩散运动的影响。

图 21-1A～C 指示的是含有探针的基于流体力学的分析方法中的模式 I。通常，生物大分子（如 DNA）的一端被固定在玻片的表面上以使其不能自由活动。生物大分子的另一端则会以化学键结合的方式和微米尺度的探针相连，探针多数是聚合物、硅石或超顺磁性材料构成的珠子。玻片表面上有液流通过，模板 DNA 分子因为液流加在探针珠子上的摩擦力而顺着液流的方向被牵拉起来。微流控装置中的液流主要被黏滞力所影

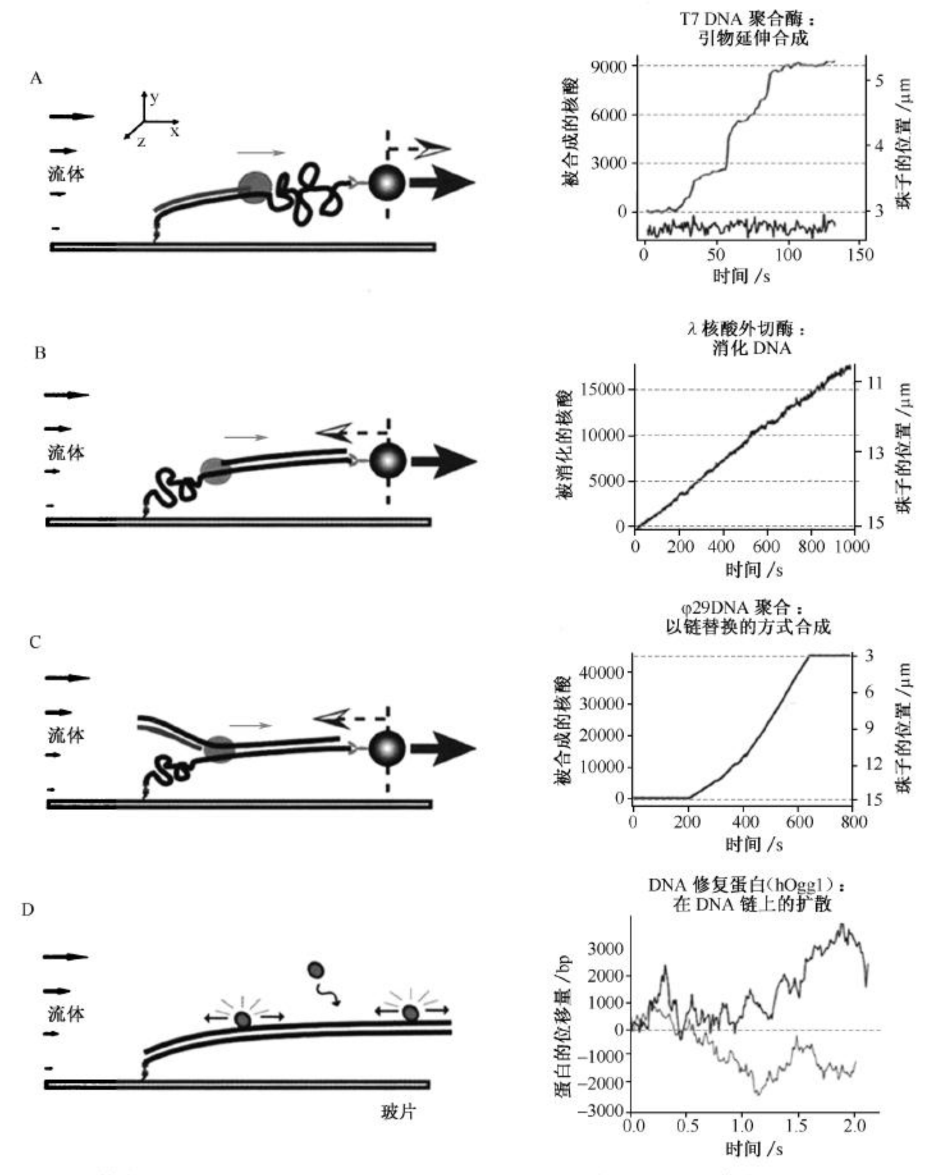



图 21-1　流体牵张力 DNA 分析方法。A. 含有超顺磁性材料珠子作为探针的流体牵张力 DNA 分析示意图。示意图展示了 DNA 聚合酶指导的与模板 DNA 互补的寡聚核苷酸从其游离的 3′羟基处开始引物延伸合成 DNA 的酶活动。在低力场下，DNA 模板的长度会随着合成双链 DNA 的增多而增加(见图 21-2)。画有阴影的箭头指示了由酶活动引起的珠子运动，实心箭头表示流体对珠子的施力方向，灰色箭头则表示了酶的前进方向。数据曲线表现了由 T7 DNA 聚合酶指导的引物延伸和珠子相对固定点的位置变化。下部的曲线展示了实验中流体运动横截面上的珠子轨迹。珠子轨迹的散布性表明珠子在溶液中可以自由活动并且在酶活动期间没有和玻片表面产生相互作用。B. 外切核酸酶分解 DNA。在低力场下，随着双链 DNA 转变为单链 DNA，模板 DNA 的长度变短。数据图展示的是由流体牵张力 DNA 分析得到的 λ 外切核酸酶引起的 DNA 分解轨迹。C. 由 φ29 DNA 聚合酶指导的链置换的 DNA 合成。聚合酶用 DNA 双链中的“上链”（非固定在玻片表面的那一条）作为模板合成并在复制叉前将双链 DNA 置换掉。在低力场下，随着 DNA 双链向单链的转化，DNA 模板长度缩短。D. 去掉探针珠子的流体牵张力 DNA 分析方法被用来研究特异或非特异的 DNA 与蛋白质间的相互作用，其中被流体牵拉的 DNA 上有荧光标记分子。数据图表现出被荧光标记上的人羟基鸟嘌呤糖苷酶（hOgg1）在模板 DNA 上扩散。

响，从而导致了层流的出现。因此，液流顺着流线在确定的流体路径中通过，同时在实验中探针珠子受到恒定流速的流体力作用，并且珠子在垂直玻片表面上的位置是固定的。假如珠子的材料是超顺磁性的，在玻片表面上由稀土磁铁造成的磁场会给探针珠子施加一个流体运动方向的横截面上的作用力（约 0.5 pN），从而将珠子在实验过程中轻微地抬离玻片表面。磁力要比液流产生的作用力小很多，流体作用力的大小范围在 1.0 皮牛到几十皮牛之间。施加多大磁力是可选择的，尽管在实验中磁场能够将珠子和玻片表面的非特异性作用最小化，并可增加有用的活动拴绳轨迹的百分比。该分析方法在实验中是测量珠子重心在所记录的图像中的位置变化。我们能够实时地知道在恒定牵拉作用力下导致 DNA 伸展程度变化的酶或结合 DNA 的蛋白质的活动情况。

液流牵张力分析的第一种情形（模式 I）需要探针珠子结合到 DNA 模板的一端。研究催化合成或消化 DNA 的核酸酶时，上述分析方法的作用原理是双链 DNA (dsDNA)和单链 DNA（ssDNA）存在自身柔韧性的差异（图 21-2）（Maier et al. 2000；Wuite et al. 2000）。双链 DNA 在作用力-牵拉程度关系符合通常的螺旋状链的力模型（Marko and Siggia 1995），而单链 DNA 在作用力下的表现取决于其序列和缓冲液离子强度。在低模板力下，因为双链 DNA 自身双螺旋的硬度和较大的构象保持长度 (persistence length)，因而相较单链 DNA 具有更大程度的伸展。单链 DNA 的磷酸骨架比起双链 DNA 来说拥有更大的弹性，因此，在低模板力下其延伸程度要比双链 DNA 小。但在高模板力下，由于 ssDNA 增强的弹性导致更大的聚合物伸直长度，ssD-NA 比 dsDNA 展现出更大的延展性（如聚合物的全伸展长度）。

我们可以通过该分析方法的模式 I 来研究众多的核酸酶。当研究的是依赖于核酸的酶时（包括链置换和引物延伸合成 DNA 的聚合酶，见图 21-1），被牵拉的模板 DNA 的长度在实验中随着双链 DNA 的下游被 DNA 聚合酶转化为单链 DNA 或与之相反的过程而发生变化。图 21-1A 示意了 T7 DNA 聚合酶指导的引物延伸合成 DNA。在上述情况中，ssDNA 模板与互补的寡聚核苷酸引物一起温育。T7 DNA 聚合酶和 dNTP 一起被引入体系中，然后在引物的 3′羟基处开始合成。随着单链 DNA 转变为双链，在力强度的交叉点以下（见图 21-2）的操作会导致模板 DNA 的长度增大，同时珠子会远离固定点（见图 21-1A 中画有阴影的箭头指示）。图 21-1B 展示了由 λ 外切核酸酶指导的双链 DNA 分解。在这种情形中，随着酶逐步前进消化双链 DNA 的上半部分，双链 DNA 逐渐变成单链。在力强度的交叉点以下，珠子向着固定点靠近并且模板 DNA 长度缩短。最后，图 21-1C 示意性地说明了链置换的 DNA 合成。在该种情况下，DNA 聚合酶使用双链中上面的那条链作为模板。DNA 的合成从结合在模板链（非固定链）的寡聚核苷酸引物处开始，在力强度的交叉点以下，随着双链 DNA 转变为单链，模板双链 DNA 的长度缩短。图 21-1C 展示了一个由 φ29 DNA 聚合酶指导的样品合成在分析方法中的轨迹。

探针珠子的液流牵张力分析的第一种模式中，在研究核酸依赖的酶活动前，必须在缓冲液中对双链和单链 DNA 的作用力-牵拉程度关系曲线进行测量和校准。在研究酶活动中使用的模板 DNA 也必须进行校准。当 DNA 分子的两端分别被表面和珠子固定后，酶缓冲液（不含有酶）就流进微流室中，然后对双链 DNA 的延伸长度进行记录以获得其作为流速的函数。单链模板 DNA 必须重新校准一次。为了得到单链 DNA，我

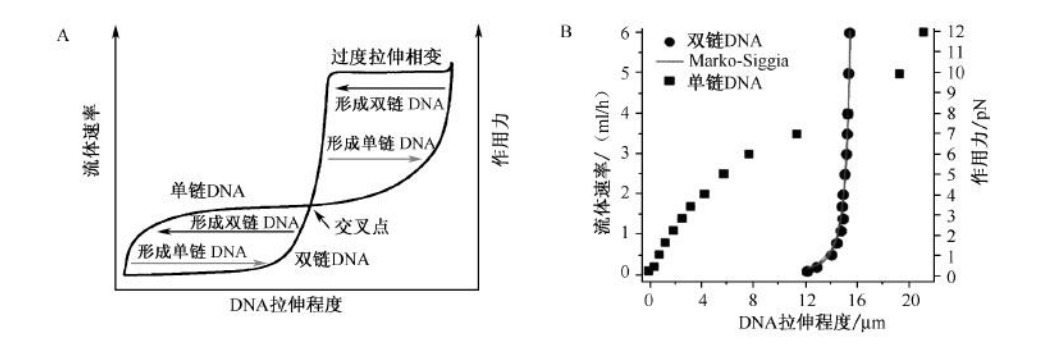



图 21-2 双链 DNA 和单链 DNA 的作用力-伸展曲线。A. 流速和模板力函数的双链及单链 DNA 的作用力-伸展程度示意图。核酸酶的单分子研究要求双链和单链 DNA 在同样的流速下的牵拉程度要有明显的差异。B. 实验测定容积流率和探针珠子上作用力与双链 DNA、单链 DNA 伸展程度的函数关系。双链 DNA 的作用力-伸展程度曲线能很好地符合描述螺旋状链（如半柔性的）的 Marko-Siggia 关系式（WLC）。

们可以将双链 DNA 在 95℃的 2 mmol/L NaOH 溶液（Maier et al. 2000）中加热变性 5 min，然后放置于冰上快速淬灭，最后在 pH7～9 的缓冲液中稀释。

将实验测定得到的流速-DNA 伸展程度曲线重新表述为作用力-伸展程度曲线通常是很方便的。(图 21-2B)。在水力冲击下的一端拴系有珠子的 DNA 分子在伸展的时候和超阻尼的钟摆十分相似（Strick et al. 1998）。按照图 21-1A 的原理图，模板 DNA 被固定于其上的珠子所受到的流体冲力在 $x$ 轴方向上给牵拉起来。流体冲击施加在珠子上的力与模板 DNA 的熵回复力方向相反。我们可以利用均分定理对珠子位置脉动的幅度直接计算，得出伸展作用力。而珠子在恒定流速时，在横截面方向（$z$ 轴）的位置脉动可以用来计算模板 DNA 上的受力。此外，在液流方向（$x$ 轴）上珠子波动的幅度主要是受力梯度控制的，后者与恒定牵拉作用力下 DNA 伸展相关。特别要指出珠子在横截面上的位置波动（$\Delta z^2$）由 $\Delta z^2 = kTl/F$ 这个关系式确定，式中，$k$ 为玻耳兹曼常数；$T$ 为绝对温度；$l$ 为模板的伸展长度；$F$ 为模板力。最后要指出，珠子在流体运动方向上的位置波动（$\Delta x^2$）由 $\Delta x^2 = kT/(\partial F/\partial x)$这个关系式决定。在玻片表面垂直方向上用稀土磁铁给予磁场力时，可以在无流体的情况下通过实验测量珠子在 $x$-$z$ 平面的位置波动，并利用 $\Delta z^2$关系式来计算珠子所受的磁力。在实验室操作流体牵张力分析实验时，如果将稀土磁铁装载在有纵轴（$y$）平移能力的装置上对实验较有帮助。在上述情况下，我们可以在开始液流实验前，在无液流条件下实验测得加载于珠子的磁力，后者是从液流小室表面磁力分离的函数。

在校准核酸的作用力-伸展程度曲线和完成 DNA 分子与珠子的绑定后，酶的（或者是结合 DNA 的蛋白质）缓冲液通过液体交换被输送进液流小室中。在这一步中，实验条件中的流体速率（或模板力）始终处于双链 DNA 和单链 DNA 作用力-伸展曲线交叉点的上部或下部。确定单个酶分子模板位置的原理是单链 DNA 和双链 DNA 在实验模板力条件下的伸展程度不同。在上述情形中，酶模板位置可以通过测量珠子重心的瞬时位置后再计算得出。

如前所述，液流牵张力分析法也可应用在另外的分析模型中。在模式 II 中，并无珠子或微粒作为探针用于探测 DNA 的伸展程度。在这种情况，通常通过观察以可逆或非可逆方式结合的荧光标记的 DNA 结合蛋白（图 21-1D）。如上所述，流体直接在模板 DNA 上施加作用力从而牵拉聚合物。通常会使用全内反射显微镜（TIRM）对该模式下荧光标记蛋白进行观察。

在模式 II 的操作中，为了得到作为体积流量函数的模板 DNA 伸展程度，必须先在 DNA 骨架上嵌入染料（如 SYTOX 或 YOYO-1 等）后进行校准。图 21-3A 显示了通过 TIRM 得到的液流牵张力分析中 SYTOX 染料染色的 λDNA 的实验图像。为了校准并得到作为体积流量函数的 DNA 伸展程度，必须保证模板 DNA 在实验所用的流体速率下能够充分伸展（伸展程度大于其全长的 90%）。上述条件保证了通过重心测定得到的

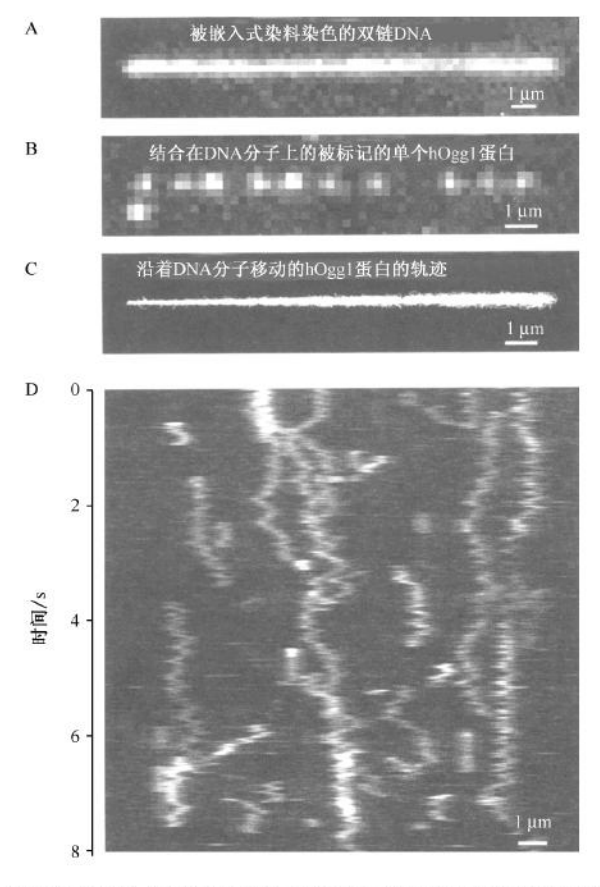



图 21-3 用于研究 DNA 结合蛋白在 DNA 分子上的非特异性扩散的液流牵张力分析方法。A. 在伸展状态下被 SYTOX 染料染色的 λDNA 分子。B. 完整无损的 DNA 分子上结合上 10 个 hOgg1 酶分子的图像。非共线信号来源于表面吸附的酶分子。C. 150 s 后 700 个酶分子在完整的 λDNA 分子上的扩散轨迹。D. 记录曲线表明 hOgg1 在 DNA 上的运动是时间的函数。

DNA 上的蛋白质位置真正对应于伸展期间的染色体 DNA 位置。该条件同样确保了剪切流中由固定于表面的聚合物的周期动力学特性（Doyle et al. 2000；Schroeder et al. 2005）所引起的模板 DNA 骨架的位置波动幅度，要小于由 DNA 结合蛋白活动引起的运动幅度（Blainey et al. 2006）。

液流牵张力分析方法曾被用于研究 DNA 结合蛋白在 DNA 分子上的非特异性扩散（Blainey et al. 2006；Graneli et al. 2006）。举一个例子，人羟基鸟嘌呤糖苷酶 1（hOgg1）这个 DNA 修复蛋白的活动状况就是使用 TIRM 观察荧光标记蛋白沿着流体牵拉的 DNA 分子在一个方向上扩散而得到的。图 21-3B 显示了好几个 hOgg1 蛋白结合在同一条 DNA 分子上的图像，但在该实验中，DNA 的骨架并没有被荧光标记。图 21-3C展示了大约 700 个蛋白质在单个 DNA 分子上的扩散运动的多次轨迹覆盖图像。图 21-3D 则展现了作为时间函数的 DNA 分子上的 hOgg1 的记录轨迹。轨迹图是通过从系列图像的每帧图像中沿着 DNA 提取一条像素带，然后将提取的像素带重新排列为二维图像而构成的，该轨迹图具有一个空间坐标（即在 DNA 伸展方向上的位置）和一个时间坐标。

## 液流牵张力分析法的应用

液流牵张力分析法是可以应用于研究多种系统的单分子手段（表 21-2）。具体来说，该分析方法能够运用于研究行进型的或非行进型的核酸酶的活动，特异或非特异的 DNA 结合蛋白相互作用以及核酸依赖的蛋白质间相互作用。除此之外，该分析方法也能用来研究包括 DNA 链的压缩/解压缩和链置换现象等核酸动力学行为。根据不同的研究目的，为了获得最佳的效果，上述分析方法在操作上会有一些差异。

**表 21-2　液流牵张力分析法的应用实例和实验操作对仪器的要求**

| 应用/系统 | 是否需要探针珠子 | 实验仪器/材料 | 被研究的生化系统 | 注解 |
|---|---|---|---|---|
| 快速行进型核酸酶系统 | 需要 | 注水泵、商售的暗场或明场显微镜、宽场荧光显微镜、10×低孔径(NA)物镜(暗场)或高孔径物镜(荧光) | λ 外切核酸酶(van Oijen et al. 2003)、φ29 DNA 聚合酶、T7 复制子(Lee et al. 2006) | 一般来说，通过散射或荧光对珠子成像；流体和机械性波动的时间尺度与酶的活性时间相比是很大的 |
| 慢速非行进型核酸酶系统 | 需要 | 高稳定的压力驱动的流体、透镜暗场照明系统、10×0.45孔径物镜 | 人类免疫缺陷病毒反转录酶(Kim et al. 2007) | 消除了波动现象的注水泵提供了长期稳定性、激光透镜照明系统 |
| 特异结合 DNA 的蛋白质间相互作用 | 不需要(见注解) | 注水泵、宽场/全内反射荧光显微镜、60×1.45 孔径物镜 | 限制性内切核酸酶(结合) | 假设蛋白质被荧光标记，如果 DNA 结合蛋白改变了 DNA 长度，就换上探针珠子和暗场成像及使用稳定的流体系统 |

| 应用/系统 | 是否需要探针珠子 | 实验仪器/材料 | 被研究的生化系统 | 注解 |
|---|---|---|---|---|
| 非特异DNA结合蛋白质间的相互作用 | 不需要(见注解) | 注水泵、宽场/全内反射荧光显微镜、60×1.45孔径物镜 | hOgg1(Blainey et al. 2006) | 假设蛋白质被荧光标记，如果DNA结合蛋白改变了DNA长度，就换上探针珠子和暗场成像及使用稳定的流体系统 |
| 核酸模板上的蛋白质-蛋白质的相互作用 | 需要 | 注水泵、宽场(近全内反射)荧光显微镜、60×1.45孔径物镜 | φ29 DNA聚合酶/枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)RNA聚合酶 | 探针珠子和荧光mRNA转录本或mRNA聚合酶的荧光成像的组合 |

注：除非特别说明，否则所有的弱光成像应用都需要有CCD摄像头。

总的来说，在使用该实验方法进行研究前必须对一些条件进行考虑：如探针珠子的存在与否，长时间流动的液体的速率和机械稳定性以及光学探测的方法等（散射或荧光）。对核酸依赖的酶催化DNA合成或分解活动的探测得益于模式I构型（如结合探针珠子的DNA模板）所提供的较高检出分辨率。快速的前进型核酸酶（如具有化学催化步骤反应速度常数 $k_{cat}$=约100/s的DNA聚合酶）一般在液流模板伸展力中不需要有长时间（如长达1 h）的稳定性。因此实验中使用空气作为缓冲液的串联注射泵（syringe pump）就可以了。在这个液流装置中，流体被注水泵从液流小室管线另一端（进水口）的流体源头处牵引着经过液流小室。为了缓冲从注水泵来的流体波动，一系列部分填充的密封储集层串联放置在注水泵和流动小室之间。除此之外，我们可以用暗场（或明场）显微镜对快速前进型核酸酶观测过程中探针珠子上的散射光成像。与之相反的是，在研究较慢的非前进型核酸酶的时候，就必须有长期稳定的流体驱动力和显微镜、照明系统的机械稳定性。在这种情形时，压力驱动调节的供流系统和透镜暗场照明（见实验方案5）对于较长时间酶活动的研究就是必需的（Kim et al. 2007）。在这个液流装置中，被引入液流小室的流体先储存在由压力调节器精密控制的密封导管中。同时在含有流体的密封导管中还有一块内径很小的管子，该管子自密封导管中突出，然后和液流小室的入水管相连通。密封导管和大气的压力差可以造成十分稳定的液体流动（Kim et al. 2007）。

## 从微观角度看剪切流中固定在DNA上的珠子受力

在这节内容中，我们将探讨模式I中连有探针珠子的模板DNA的定量物理模型。我们从流体作用下的固定在DNA上的探针珠子的稳态受力平衡开始探讨。使用图21-1A的坐标系可知力的平衡状态可以表述为

$$\boldsymbol{F}_{mag} + \boldsymbol{F}_{flow} + \boldsymbol{F}_{tether} + \boldsymbol{F}_{Br} = 0 \tag{1}$$

式中，$\boldsymbol{F}_{mag}$表示磁力；$\boldsymbol{F}_{flow}$表示流体作用力；$\boldsymbol{F}_{tether}$表示的是DNA链的熵回复力；$\boldsymbol{F}_{Br}$则表示的是随机布朗运动的作用力，黑体表示字母代表的是向量。我们对等式（1）取均值并利用布朗运动在各向同性的特征得到 $\langle \boldsymbol{F}_{Br} \rangle = 0$，平均值由括号（⟨⟩）表示。我们

将流体运动的方向取为 $x$ 轴和垂直方向定为 $y$ 轴。在 $x$ 轴方向的作用力的平衡方程为

$$\zeta U - \cos(\theta) F_{\text{tether}} = 0 \tag{2}$$

式中，$\boldsymbol{F}_{\text{flow}}$ 的大小取决于探针珠子的柔韧性［$\zeta=6\pi\eta R$，从具有半径 $R$ 的珠子的斯托克阻力（Stokes' drag）关系得到］和整体流速（$U$）以及 DNA 固定端和表面所成的角度（$\cos\theta= x/\sqrt{x^2+y^2}$，式中，$x$ 为 DNA 伸展长度在 $x$-$z$ 平面上的投影；$y$ 为珠子距表面的垂直高度）。在平面附近，流体速度随着垂直高度（$y$）的变化而成线性变化，可得 $U=cy$，$c$ 表示的是切变速率常数。所以在曲面法线方向上的作用力平衡方程是

$$\boldsymbol{F}_{\text{mag}} - \sin(\theta) \boldsymbol{F}_{\text{tether}} = 0 \tag{3}$$

对于双链 DNA，我们根据螺旋状链的作用力方程（worm-like chain force relation）（Marko and Siggia 1995）计算熵回复力 $\boldsymbol{F}_{\text{tether}}$。

公式（2）和公式（3）能用来计算珠子的运动轨迹［如稳定状态下珠子的位置（$x$，$y$）就是磁力和流体作用力的函数］。通过公式（2）和公式（3）以及测量得到 DNA 伸展长度（或可同样用于计算的流体作用力），再根据磁力大小，我们就能计算出珠子在正常的实验条件，即磁力大小为 0.6 pN 和流速为 2.0 ml/h（根据我们液流小室孔径的大小相应可得流体作用力为 3.7 pN）的情况下离表面约为 250 nm。回忆一下我们首先测量无流体运动时珠子在 $x$-$z$ 平面上的位置波动（$\Delta z^2$），然后利用均分定理得到表达式 $\Delta z^2 = kTl/F$（式中，$k$ 为玻耳兹曼常数；$T$ 为绝对温度；$l$ 为模板被牵拉后的长度；$F$ 为珠子所受的磁力）计算得出作用在珠子上的磁力。在上述表达式中的 $\Delta z^2$，即珠子离开平面的距离（同理可得 $l$），可以通过测定（在高数值孔径约为 1.45 的物镜下有几微米的误差）珠子在无磁力作用和磁力作用两种情形中距表面相对距离得到。公式（2）和公式（3）还能用来计算在特定流速下的 $\boldsymbol{F}_{\text{mag}}$，从而可以估计出为了使固定在 DNA 上的探针珠子维持在表面上 200 nm 处需要多大的磁力（Kim et al. 2007）。在高流速下，因为 $\boldsymbol{F}_{\text{tether}}$ 在垂直方向上分量的增大，所以磁力也必须增加来平衡 $\boldsymbol{F}_{\text{tether}}$ 将珠子拉向表面的趋势。

在实验中，我们通常测量 DNA 伸展长度在 $x$ 轴的投影，而非直接测量 DNA 的长度。在这里，我们通过几何学论证来证明 DNA 伸展长度在 $x$ 轴投影确实是 DNA 真实长度的体现，即使存在一些微小的误差。通过论证后，我们就可以不用对 DNA 的投影长度进行修正。在较低的伸展作用力区间（约 4 pN），单链 DNA 的 $L$（投影长度）是 4.4 μm，而双链 DNA 则是 15.1 μm。将珠子中心（$H$）距表面的距离定义为垂直高度，即珠子的半径再加上 250 nm，基于投影［$(1-\cos\theta)\times 100\%$］产生的单链 DNA 长度的误差最大为 3.8%，而双链 DNA 的最大误差是 0.5%。此外，之前给出的单链和双链 DNA 的作用力伸展程度曲线，即是我们评判酶活动的标准，也基于同样的几何论证得出。因此，在较低的流体牵拉作用力下，使用投影长度并不会产生显著的误差。

基于上述讨论，我们可以通过以下的关系式计算得出在酶促反应下（合成或分解）被转化的核苷酸数目：

$$N(t) = \left( \frac{|L(t) - L_{\text{initial}}|}{|L_{\text{ds}} - L_{\text{ss}}|} \right) N_{\text{tot}} \tag{4}$$

式中，$N(t)$ 为被酶转化的核苷酸数目，是时间的函数；$N_{\text{tot}}$ 为模板上所有核苷酸数目；$L_{\text{ds}}$ 为双链 DNA 的伸展长度（特定作用力下）；$L_{\text{ss}}$ 为单链 DNA 的伸展长度（特定作用力下）；$L_{\text{initial}}$ 为实验开始时 DNA 模板的初始长度；而 $L(t)$ 为在酶促反应发生后

某一特定时刻的 DNA 长度。上述的线性关系式忽略了因为使用投影长度而产生的微小误差。

## 光学、摄影和重心测定

在样品（如探针珠子或荧光分子）中一个高度精确地估计光子源位置的方法是先获得图像，然后用二维高斯方程来拟合衍射极限图像或射线径向对称的图像。对特定图像中每个分子的光子数目（$N$）的获得决定了重心位置的精确程度。利用显微镜点扩散函数的宽度（$s$）、像素大小（$a$）、背景水平的标准差（$b$），根据 Thompson 等（2002），我们可以计算特定位置的固定光源的标准误（$\sigma$）

$$\sigma=\left[\frac{s^2}{N}+\frac{a^2/12}{N}+\frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}\right]^{1/2} \tag{5}$$

通过观察珠子或吸附在玻片上的荧光分子可以经验性地得到误差。

在之后的章节中，由于实验装置的不同，我们将分别处理实验类型。实际上，两种类型的实验都可以在配备荧光和暗场激发的显微镜中完成。

### 对系有探针珠子的 DNA 伸展的观察

在用探针珠子的实验中，为了同时检测许多 DNA 拴绳，最好将观察的视野最大化。优化图像放大倍数将有助于达到确定珠子质心的高度精确性，这将优化 DNA 长度的分辨率。从实用的角度，视野最大化要求在显微镜输出时，光学上采用低倍物镜和（或）缩倍光学系统，这也有助于利用该分析多路复用的特性。通常情形下，为了缩小输出图像，我们需要 4×～10×的物镜和 0.1×～0.5×的中继透镜（relay len）。一般高数值孔径物镜提供较小的景深，从而可能造成表面缺陷或珠子恰好不在图像平面中。因此，高数值孔径物镜在观测时要尽量将图像中多余的物体消除，这可以让束缚在 DNA 上的珠子的图像之后的分析简单化。此外，较高数值孔径物镜的高收集效率和较窄的点扩散函数显著提高重心判定的精确性，从而获得高空间分辨率轨迹。然而，令人遗憾的是，低放大倍数物镜通常也拥有低数值孔径，因此我们不得不在具有较大视野的低数值孔径（0.1～0.25）低放大倍数（如 10×）的物镜和导致景深减小和更精确的重心判定的高数值孔径（1.2～1.45）高放大倍数（60×）的物镜之间进行权衡。对于绝大多数实验，暗场照明下 NA=0.25 的 10×空气镜就足够了。如果小心处理滤液并将多余的未连接 DNA 的珠子冲洗掉，干扰轨迹事后分析的伪信号将大大减小。

在明场、暗场或荧光下对较大的珠子进行低采集速率（1～10 Hz）成像时，每一帧图像都囊括大量光子（$N$）。大量的光子造成了摄像灵敏性和相对单个荧光分子成像的低噪声。对有大量光子的图像来说，重心位置的精确度取决于点扩散函数宽度的缩小和使用能得到合适像素尺寸图像的总放大倍数。一般来说，像素大小等于珠子图像的全宽半峰值（full-width half-maximum，FWHM）的一半为适。高放大倍数（如较小的像素尺寸）会导致在重心确定的精确性上逐渐减小增益，并造成文件大小的膨胀（由像素大小的平方确定），同时还会因为视野的限制而降低多路复用数据处理的能力。然而有时为了尽可能地精确定位重心，高放大倍数也是有利的，它可以允许在照相机饱和的

范围内在每一帧图像中收集每一个珠子上更多光子。

在选择相机进行这类型实验时要考虑的重要参数有分辨率（通常要求较高）、物理像素尺寸（每个珠子图像的全宽半峰值为1～3像素）、较大的满井容量（full-well capacity）（从而可以使每帧图像收集更多的光子而不会使相机饱和）。具有数字或模拟方式输出信号非常便宜的单色电荷耦合器件（CCD）照相机的灵敏性和噪声水平合适于这类成像，但也有分辨率低、视野较小及在每幅珠子图像的全宽半峰值为2个像素时多路复用能力受限的弊端。最佳的相机特性应该是具有较高的分辨率（100万像素或以上）以及较大的动态范围（10～16 bit的信号输出），从而能够和照相机的物理像素大小所带来的放大倍数相匹配。

关于数据获取速度，获得图像的频率比实验中珠子在纵向（流体运动方向上）脉动的摄动谱分布（power spectral distribution，PSD）拐角频率（corner frequency）快并没有用。取样频率低于摄动谱分布拐角频率保证了珠子处于简谐势谷的平衡状态，并确保了数据取样的结果表示的并非珠子扩散的布朗运动。对于固定在λDNA（见本章内容）上直径为2.8 μm的珠子来说，在伸展力约为3.5 pN时，摄动谱分布拐角频率大概是240 Hz。一般情况下，低获取频率（0.1～1Hz）被用于含探针珠子的实验。上述实验的分辨率（如酶在模板DNA上的位置的精确度）和取样频率相关。例如，在酶的$k_{cat}$约等于100/s并且取样频率为1 Hz时，该分析方法的分辨率大约为100 bp。对于大多数实验来说，这个稍微小于实验中包括流体噪声和阶段漂移的本征涨落的分辨率就足够了。研究人员应该在充分考虑我们上述讨论和实验中本征涨落程度后选择合适的取样频率来获得理想的分辨率。此外，选择较低采样频率的附加好处是文件不会太大。

应该仔细考虑实验中使用的探针珠子的物理大小。通过在本章中介绍的三种成像技术，我们知道较大的珠子有助于得到更精确的重心位置。较大的珠子因为更好的光子统计分布特性和较缓慢的散布导致图像扩散的减小，从而造成较高的信号。但有些情形就要使用较小的珠子。例如，当实验需要较高时间分辨率时（较高的摄动谱分布拐角频率），或DNA离表面很近的情况（如使用全内反射显微镜对DNA或结合在DNA上的蛋白质进行观测）。

## 对结合DNA的荧光蛋白的观测

在荧光观测实验中，包括光子收集效率的最大化，荧光背景的最小化和缩小检测器噪声从而有助于提高重心精确度的光学和信号检测等条件的选择是相当重要的。

在单个荧光分子的情形下获得质心精确定位的最优化条件与在大型珠子中不同。因为对单分子的荧光基团的探测中仅能收集到数量有限的光子，所以实验中图像的噪声水平就显得至关重要。实验中当荧光分子在缓冲液中时，全内反射显微镜的照明系统能够使噪声水平降低。考虑到绝大多数的灵敏的照相机具有较大的像素尺寸（10～30 μm），对于每个半峰值全宽（FWHM）为0.5～3个像素单元来说，较高的物镜放大倍数（40×～100×）是必需的。可以通过运用Webb公式［上一节中的关系式（5)］，在实验测量得到$N$、$b$和$s$的值后，做出$\sigma$-$a$的曲线来估计半峰值全宽的最佳像素值。高数值孔径物镜带来较高的光子收集效率，同时在玻璃/液体界面有较高的物镜型全内反射能力。

我们可以通过多种方法达到较低的背景水平。使用光学滤色片和合适的特备激光激发的带通滤色片镜片是十分重要的（有些滤色片不适合于强激光场激发的荧光）。选择滤色片的一个重要原则是要确保没有激发光直接轰击在探测器上。对于落射荧光或棱镜型全内反射显微镜来说，单个干扰发射滤色片（长通或带通的）的激发线（excitation line）有超过 6 OD 的光密度（OD）就足够了。物镜型全内反射显微镜则使输出光线直接作用在光学滤色片上。某些情况下必须使用物镜后聚焦面（back focal plane）上的遮光光阑（opaque beam stop）或多重发射滤色片来衰减至合适的程度。

浸没液体也是背景荧光和拉曼散射的重要来源之一。对于给定的激发光源和发射滤色片，我们要对大量的低荧光浸没液体进行测试以得到最佳的选择。物镜甚至是玻片都能产生数量可观的背景光线，另一种可能产生背景光线的情况（如特别设计的物镜或石英玻片）是使用波长小于 550 nm 的激光作为激发光源。此外，所有的溶液和缓冲液都必须小心制备以及过滤（0.2 μm 孔径的过滤器），从而避免液体内含有尘埃和荧光物质。最后要说明的是，因为实验要求溶液中有荧光分子的存在，所以表面处理和（或）施加阻断剂来减小其聚集的程度是必要的。当背景荧光主要来源于激光功率的相关强度（如功率/面积）时，可以通过减小照明视场的尺寸（如直径为 20 μm）来获得更好的信噪比。

对于用于单分子宽场成像的相机来说，最主要的要求是灵敏度以及在所需的读出速率时的噪声。现在，帧传递 CCD 的量子效率大于 90%。这样的 CCD 能以较快的占空比（duty cycle）来对光子计数以及获得精细的探测灵敏性。但在评估相机噪声的时候还有更多仔细的要求。数字式 CCD 的噪声主要有两种类型：暗电流和读出噪声（增强型和电子倍增的照相机有第三种类型的噪声，以下讨论）。暗电流中的散射噪声（shot noise）和像素与像素之间的差异在单分子高速观察时不是主要的问题。这些问题可以通过冷却探测器（许多照相机中整合了使传感器保持在−80～20℃的珀尔帖制冷器）和暗帧差法（dark-frame subtraction）来解决。

在取帧频率较低时（<1 Hz），慢速扫描的照相机最好要有很低的读出噪声。在读出噪声照相机工作中，可以在积分时间（integration time）从单分子获得大量的光子，并以较小的读出噪声获取较高的信噪比。随着取样频率的增加，读噪声越来越成为一个麻烦。这既是因为快速运作的模拟数字转换器（ADC）有更高的电子噪声，也是因为在积分时间内获得的光子较少，从而造成读出噪声的相对增大。有两种技术被发展出来解决这个问题：图像增强型 CCD 和电子倍增型 CCD。因为电子倍增型 CCD 的成本低廉，再加上其鲁棒、固态设计的特点，在高灵敏性显微镜方法中图像增强型 CCD 已经被电子倍增 CCD 所取代。以上两种技术的功能是在模拟数字转换器读出信号前获得信号，从而显著地减小相对读出噪声（有效读出噪声）。放大型 CCD 相对于非放大型 CCD 的信号改善是巨大的，但信号放大的过程也会带来超额噪声，并且高速运作的模拟数字转换器也会产生较高的读出噪声，从而将放大型 CCD 带来的好处给抵消了一部分。此外，不同机器带来的超额噪声，甚至是同一照相设备下的不同样品的超额噪声也大不相同。因此，我们必须详细考察每一个照相仪器中和增益调整（gain setting）相关的噪声表现。

优化组合在被牵拉 DNA 上的荧光分子成像的积分时间是一个复杂的过程，它取决

于以下几个因素：计数率、背景、照相机特性、要求的空间分辨率、漂白速率、结合反应的持续时间和频率以及流速（影响了 DNA 脉动的时间尺度）。我们最后来考虑可选用的最大采样速率。我们可以通过观察插入型染料染色的被流体牵拉的 DNA 来估计 DNA 脉动的时间尺度（Blainey et al. 2006）。对于本章描述的液流小室和 10 ml/h 的容积流率，DNA（以 λDNA，48.5 kb 计算）的脉动时间尺度大约是 0.02 s。因此，大于每秒 40～50 帧的取样频率将会导致增益的减少。

## 液流牵张力分析方法的实施：特别的条件

在液流牵张力分析方法的实验中有 5 个主要的因素：聚乙二醇/生物素功能化玻片、地高辛抗体功能化珠子、制备核酸模板（λDNA 是后续样品的模板）、微流体室的准备和对珠子或荧光标记蛋白的光学成像方法。上述问题将在后面的实验方案中进行讨论。

# 实验方案1：通过结合聚乙二醇、羧酸盐和生物素功能化玻片

在这详细介绍了聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）与玻片表面共价结合的方法。Ha（2002）等首先使用该种方法来对荧光显微镜观测的样品进行了制备。玻片的功能化产生了链霉亲和素的结合位点，减少了其表面对DNA的吸附，同时钝化了表面对蛋白质的结合能力。后者相对更重要，因为结合了蛋白质的珠子对固定的DNA的操纵能力降低。除此之外，对酶的吸附导致浓度的降低会相应造成水溶性的降低，同时对荧光标记材料的吸附会造成较高的背景荧光，从而使对单个荧光分子的检测不易。因为其中几个孵育步骤所花的时间较长，所以整个实验需要一整天来完成。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

### 试剂

（3-氨丙基）三乙氧基硅烷（Sigma-Aldrich）<!>
　　在4℃下保存。
丙酮（ACS grade，Mallinckrodt Chemicals）<!>
碳酸氢盐缓冲液（pH 8.3，0.1 mol/L）（可选用1.0 mol/L浓度的，见步骤25）
　　在4℃下保存最多一周。
Biotin-PEG-NHS（分子质量5.0 kDa；Nektar）
　　在干燥环境下于−20℃保存。
乙醇（95%；Sigma-Aldrich）
KOH（1.0 mol/L）<!>
mPEG-SPA（分子质量5.0 kDa；Nektar）
　　在干燥环境下于−20℃保存。
SMB-PEG-SMB（分子质量3.4 kDa）
　　在干燥环境下于−20℃保存。
酒石酸磺基琥珀酰亚胺（sulfo-DST；Soltek Ventures）（可选，见步骤25）
　　在干燥环境下于−20℃保存。
过滤的去离子水

### 设备

超声破碎器（bath sonicator）（VWR）
烧杯（玻璃，500 ml）
玻片（玻璃，1号，24 mm×60 mm，VWR；2号，24 mm×50 mm，VWR）
干燥器（聚碳酸酯，透明的VWR）
氮气（或压缩空气），过滤<!>
移液管（玻璃）

移液管吸头盒（空的）
染色瓶（聚碳酸酯，VWR）
搅棒（玻璃）
镊子（塑料，SPI）
盛水容器（4 L 容积）

## 方法

1. 在4个染色瓶的每一个中放入5个1号玻片，小心将每个玻片分开。
2. 在染色瓶中加入95%的乙醇浸润玻片。超声10 min。
3. 倒出瓶中乙醇，小心保留其中的玻片。用去离子水冲洗染色瓶两次。
4. 在染色瓶中加入1.0 mol/L的KOH。超声粉碎10 min。
5. 弃去瓶中的KOH，小心保留其中的玻片。用水冲洗两次。
6. 重复步骤2～步骤4两次（总共用乙醇和KOH洗涤三次）。
7. 用水充分地冲洗染色瓶。
8. 将瓶中的水弃去并用丙酮冲洗。
9. 在染色瓶中装满丙酮。超声10 min。
10. 弃去丙酮，小心保留其中的玻片。再次在染色瓶中装满丙酮并静置。
11. 在500 ml的烧杯中倒入300 ml丙酮，用移液管向其中加入6 ml三乙氧基硅烷，从而形成浓度为2%的溶液。用搅棒混合该溶液直至混浊消失。
12. 每次操作一个染色瓶，弃去其中丙酮并小心保留玻片。向瓶中加入2%的三乙氧基硅烷溶液。在室温下孵育10 min，从而使三乙氧基硅烷溶液将玻片表面功能化。
13. 在4 L容器中装满去离子水。
14. 将染色瓶放入较大体积的废物缸中。用约1 L水来替换瓶中的三乙氧基硅烷和丙酮的混合液。同样处理剩下的3个染色瓶。
15. 用镊子夹住单个玻片在去离子水流中冲洗。
16. 将玻片放置在干净的塑料表面并用无颗粒的氮气或压缩空气进行干燥。

    玻片的“正面”（没有接触塑料表面的那一面）将会是功能化的表面，注意在以后的步骤中记住该面。
17. 在浓度为0.1 mol/L的1 ml的碳酸氢盐缓冲液中溶解100 mg mPEG-SPA、10 mg SMB-PEG-SMB和1 mg biotin-PEG-NHS（不要涡旋振荡或超声）。

    配好后立即使用。
18. 将两片干净并经过硅烷活化的玻片长边相靠的正面朝上放置在移液管吸头盒的网格里。
19. 在每个放置好的玻片上用移液管加上100 μl PEG溶液。
20. 在1号玻片的边上放置2号玻片作为垫片。
21. 将另外两个硅烷活化的1号玻片以正面朝下的方式放在第一对1号玻片上。这样PEG溶液就会在每对玻片之间扩散，而2号玻片则作为形似夹心饼干的1号“玻片对”的垫片。

如上所述，每个移液管吸头盒能装载两对（共4片）1号玻片，所以20个1号玻片就需要5个盒子。

22. 在室温下于盒中孵育玻片3 h，从而使活化的PEG分子可以和玻片表面的伯胺分子相互作用（见排疑解难）。
23. 用干净的塑料镊子夹住单个玻片在去离子水流中冲洗。避免玻片功能化的部位直接在水流下冲洗。

玻片PEG功能化的表面要比硅烷化的那一面更亲水。

24. 将玻片放置在无颗粒的氮气或压缩空气中进行干燥。

为了进一步抑制表面对核酸的吸附可以使用步骤25进行操作，否则直接进入步骤29。

25. 在1 ml 1.0 mol/L的碳酸氢盐中溶解30 mg sulfo-DST。

配好后立即使用。

26. 重复步骤18～步骤21，用sulfo-DST溶液替换PEG溶液，小心处理PEG功能化的玻片面。
27. 用sulfo-DST溶液在室温下孵育玻片45 min。
28. 重复步骤23和步骤24。
29. 在真空的干燥器中储藏功能化的玻片，注意功能化的表面朝上（见排疑解难）。

小心安排玻片放置的位置，以免当再往干燥器填充的时候被气体弄乱玻片。

## 排疑解难

**问题**：在孵育期间PEG溶液干掉了。

[**步骤22**]

**解决方法**：在移液管吸头盒的底部加入几毫升的水。

**问题**：在完成功能化的玻片表面出现白色沉淀物斑点。

[**步骤29**]

**解决方法**：在步骤14和步骤15中将硅烷溶液冲洗干净。

**问题**：玻片功能化不均一。

[**步骤29**]

**解决方法**：在步骤1～步骤10中就将玻片充分冲洗干净。延长超声处理的时间，将冲洗的次数增加，以及在加入乙醇和KOH的步骤时提高温度。不要在含有丙酮或丙酮溶液的步骤上提高温度，这样会有着火的危险。

## 讨论

上述的实验步骤在玻片表面形成了对蛋白质和核酸吸附的抑制，提供了机械稳定性，以及共价结合表面的生物素。自第一次对该方法报道以来（Ha et al. 2002）的主要改进是引入了负电性的PEG分子和更有效的淬灭剂伯胺，从而降低了表面对核酸的吸附，尤其是在低pH的情况下。在末端有甲氧基的单体NHS-PEG和末端有生物素的

单体 NHS-PEG 中加入 bis-NHS-PEG。bis-NHS-PEG 通过和表面的两个氨基基团的作用在实验的 pH 条件下形成了不带静电荷的酰胺键。或者另一种可能是 bis-NHS-PEG 仅和表面的一个末端相互作用，在水解第二个 NHS 基团后，在其自由端形成羧酸键。PEG 偶联后，可以用小分子质量和高可溶性的双活性物质诸如 sulfo-DST 来处理表面。sulfo-DST 较小的体型允许其穿过 PEG 层进入内部将剩余的胺淬灭。与 bis-NHS-PEG 相类似，sulfo-DST 可以两次和表面相互作用或在水解后形成羧酸基团。

## 实验方案 2：用地高辛抗体功能化超顺磁性珠子

半抗原蛋白和探针珠子的结合使其可以附着在模板 DNA 被标记的部位（Strick et al. 1996）。我们可以通过流体场或磁场梯度对超顺磁性珠子进行操纵。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有< !>的材料。

#### 试剂

地高辛抗体，羊的 Fab 片段（Roche Molecular Biochemicals）
　　使用期限内在 4℃下保存。
偶联缓冲液（0.25 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L 碳酸氢钠，pH 8.0）
　　在 4℃下可保存一周。
EDAC［*N*-[3-二甲氨基丙基]-*N*′-乙基碳二亚胺（Sigma-Aldrich)］< !>
　　在 −20℃下可保存一年。
MES（2-[*N*-吗啉］氨基乙醇酸）(25 mmol/L，pH 5.0）< !>
　　在 4℃下可保存一月。
NHS（*N*-羟基琥珀酰亚胺）(Sigma-Aldrich）< !>
NaOH（10 mmol/L）< !>
　　用前新鲜配置，4℃下保存。
淬灭缓冲液（0.5 mol/L 胆胺< !>，10%甘油和 0.25 mol/L NaCl，pH 8.4）
　　在 4℃下可保存 1 个月。
保存缓冲液（pH 7.4）
　1 mg/ml 血清蛋白（BSA）
　1 mmol/L EDTA
　10%甘油
　0.25 mol/L NaCl
　0.02%叠氮化钠< !>
　50 mmol/L 磷酸钠
　0.1% Tween 20（聚山梨酸脂制剂的商品名）
　　用前新鲜配置，4℃下保存。
超顺磁性微球（直径 2.8 μm，Dynabead M-270 羧酸；Invitrogen/Dynal Biotech）
　　在 4℃下可保存一年。
去离子水

#### 设备

超声破碎器（可选，见步骤 21）
磁铁、稀土铷铁硼、小环磁铁（National Imports Magnetic Products Division）< !>

微型离心管（1.5 ml）

转动搅拌器（VER）

涡旋搅拌器（VER）

## 方法

所用的所有缓冲液都必须经过 0.2 μm 的过滤器过滤。除非有特别说明，否则所有的步骤都应该在 4℃或冰上预冷的缓冲液中进行。准备好所有的缓冲液后，该实验大约需要 4 h。

1. 将所购的珠子溶液悬浮混合均匀（如果必要可以涡旋振荡）。将 100 μl（珠子的浓度约 3 pmol/L）的溶液放入微型离心管中（见排疑解难）。
2. 为了活化珠子表面的羧酸盐基团，将珠子和 200 μl NaOH 溶液混合。
3. 利用稀土磁铁将小管中的珠子控制在底部。
4. 利用移液管将上清液除去，要特别小心操作以免干扰珠子。
5. 重复步骤 2～步骤 4 两次（总共应进行 3 次）。
6. 在 NaOH 溶液处理后，将 NaOH 溶液换成 200 μl 的去离子水，重复步骤 2～步骤 5。完成最后一次清洗，在 200 μl 水中重悬浮珠子（见排疑解难）。
7. 在 200 μl MES 缓冲液中溶解 16 mg EDAC。
8. 在 200 μl MES 缓冲液中溶解 10 mg NHS。
9. 将珠子移到离心管底部。除去水，加入 EDAC 溶液并重悬浮珠子。
10. 加入 NHS 溶液并混合均匀样品（总体积约为 400 μl）。
11. 在室温下用转动搅拌器缓慢混合珠子 30 min。

    这一步骤使 EDAC 与 NHS 可以和珠子表面的羧酸盐基团形成 NHS 酯。
12. 在 400 μl 的偶联缓冲液中溶解 0.5 mg 地高辛抗体，冷却至 4℃。
13. 将珠子冷却至 4℃，用 200 μl MES 缓冲液清洗 2 次。
14. 用 200 μl 偶联缓冲液清洗珠子 2 次。
15. 将珠子控制在管子底部，弃去偶联缓冲液。
16. 在地高辛溶液中重新悬浮珠子。
17. 在室温下缓慢混合珠子溶液 2 h。

    这一步使地高辛的伯胺基团与珠子表面的 NHS 酯相互作用。
18. 管子中加入 200 μl 淬灭缓冲液（此时体积约为 600 μl）。
19. 在室温下缓慢混合珠子溶液 30 min。

    这一步使胆胺和残留在珠子表面的 NHS 酯相互作用。
20. 将珠子冷却至 4℃，用 400 μl 保存缓冲液清洗珠子 4 次。
21. 用保存缓冲液重悬浮珠子，最终体积 2.0 ml。用涡旋振荡和（或）超声破碎法将溶液中的聚集物打散（见排疑解难）。

    珠子浓度约为 150 fmol。
22. 将珠子溶液以 20 μl 或 100 μl 的体积在 4℃下储存，一年内可用。

## 排疑解难

**问题**：珠子很难溶解或溶液中可见珠子的凝集块。

［**步骤 1、步骤 6 或步骤 21**］

**解决方法**：猛烈地涡旋振荡珠子。如果需要，可以使用超声破碎器将凝集块打散。

**问题**：珠子没有偶联上蛋白质。

［**步骤 21**］

**解决方法**：使用新配置的 EDAC。确保在配置缓冲液和蛋白质中不含伯胺（如蛋白质从 Tris 缓冲液冻干制备时）。

## 讨论

EDAC/NHS 介导的羧酸基团和伯胺类蛋白质的偶联通常被用来将蛋白质和含羧酸基团的表面相连。上述方案最佳优化了蛋白质的偶联效率并同时降低了与珠子的交联。蛋白质和珠子结合所成的共价酰胺键具有高度稳定性的优点。将此实验方案应用于不同大小的珠子时，要注意调整蛋白质的用量从而保证其对珠子表面的比率是恒定的。对于功能化较好的珠子，足够多的蛋白质会在珠子表面形成几个密集的单层膜。为了避免珠子聚集，使用的磁性珠子必须是超顺磁性的（而非铁磁性的），这样在暴露于磁场后仅有较小的剩余磁化强度。

## 实验方案 3：构建生物素和地高辛改造的 λDNA

λ噬菌体的基因组双链 DNA 为许多单分子 DNA 实验提供了方便适用的模板。λDNA 相当长（48 502 个核酸），并且在 cos 位点的 5′端有互补的 12 bp 片段。我们可以利用半抗原改造的寡聚核苷酸及其序列能够特异结合 λDNA 末端的能力，特异性地将λ噬菌体 DNA 的一端固定在液流小室玻璃表面，同时 DNA 的另一端可以和珠子相结合。寡核苷酸发挥酶的作用在 DNA 模板和半抗原间形成牢固的共价结合。

### 材料

#### 试剂

DNA 寡聚核苷酸

寡核苷酸 1：5′-磷酸-AGGTCGCCGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-生物素-3′

寡核苷酸 2：5′-地高辛-AAAAAAAAAAAAAAAATGGTCCAACTTGCTGTCC-3′（可选，见步骤 11）

寡核苷酸 3：5′-磷酸-GGGCGGCGACCTGGACAGCAAGTTGGACCA-3′（可选，见步骤 11）

如果寡核苷酸 1 和寡核苷酸 3 上没有 5′磷酸基团，那么可以使用 T4 多聚核苷酸激酶来磷酸化寡聚核苷酸。所有的寡聚核苷酸都应经过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后在－20℃下保存。

λDNA（约 0.5 mg/ml，15 nmol/L）（New England BioLabs）

在－20℃下保存。

T4 DNA 连接酶和反应缓冲液（New England BioLabs）

在－20℃下保存。

TE 缓冲液（1 mmol/L EDTA、25 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L Tris，pH 8.0）

#### 设备

封闭加热器（block heater）（VWR）

微型离心管

### 方法

所用的所有缓冲液都必须经过 0.2 μm 的过滤器过滤。除非有特别说明，否则所有的步骤都应该在 4℃或冰上进行。为了避免弄断 λDNA，在吸取含 λDNA 的溶液时要使用较宽（如 1 mm 或更大内径）的吸头并且动作轻缓。但在吸取寡聚核苷酸时为了精确要使用正常的吸管头。绝对不能涡旋振荡或超声粉碎 λDNA。如果在 16℃下孵育样品(见步骤 10 和步骤 16)，那么整个过程会耗时约 6 h。

1. 用 TE 缓冲液将寡聚核苷酸溶解（提供的试剂是固体的话）或稀释（以溶液方式提供）至 0.1 mmol/L。

2. 在封闭加热器中65℃加热λDNA 60 s后迅速投入冰水中。

这一步破坏由分子间杂交介导形成的12 bp突出端互补的多联体。

3. 在微型离心管中加入100 μl的λDNA溶液。

4. 在9 μl TE缓冲液中加入1 μl寡核苷酸1。

5. 将2 μl的上述的寡核苷酸1溶液加入含有λDNA溶液的微型离心管中，充分混匀。

这时在溶液中的寡核苷酸1的摩尔数超过λDNA的12倍。

6. 65℃加热λDNA/寡核苷酸1混合液60 s。

7. 缓慢冷却（整个过程耗时30～69 min）溶液至室温。

这一步允许寡核苷酸通过退火和互补的λDNA突出端互补配对。

8. 将溶液置于冰上。加入T4 DNA连接酶的反应缓冲液11 μl（缓冲液终浓度为1×），轻柔地混合均匀。

9. 加入2 μl（800单位）T4 DNA连接酶。轻柔地混合均匀。

10. 在16℃下孵育溶液2 h（或4℃下过夜）。

如果是要连接上珠子的样品，从步骤11开始操作；如果仅仅将样品固定在表面的，从步骤17开始。

11. 将DNA溶液放回冰上。加入350 μl TE缓冲液，1 μl 0.1 mmol/L的寡核苷酸2和寡核苷酸3溶液。轻柔地混匀。

此时寡核苷酸2和寡核苷酸3的摩尔数超过寡核苷酸1的5倍。

12. 65℃加热λDNA/寡核苷酸1/寡核苷酸2/寡核苷酸3混合液60 s。

13. 缓慢冷却（整个过程耗时30～69 min）溶液至室温。

这一步允许寡核苷酸2和寡核苷酸3通过退火相互配对及与寡核苷酸1结合端的DNA的另一端配对上。

14. 将DNA溶液放在冰上。加入T4 DNA连接酶的反应缓冲液39 μl（缓冲液终浓度为1×），使整个溶液体积达到0.5 ml。轻柔混匀。

15. 加入2 μl（800单位）T4 DNA连接酶。轻柔混匀。

16. 在16℃下孵育溶液2 h（或4℃下过夜）。

DNA的浓度为3 nmol/L。

17. 将构建完成的DNA溶液以20 μl或25 μl分装储藏于－20℃，一年内可用（见排疑解难）。

4℃的日常储存可达1周，但要避免反复冻融。

## 排疑解难

**问题**：剩余的DNA连接酶或寡核苷酸1/寡核苷酸2/寡核苷酸3形成的副产品影响了分析。

［**步骤17**］

**解决方法**：用β-琼胶酶消化或异丙醇沉淀回收后通过琼脂糖凝胶电泳纯化。

**问题**：产生不需要的2倍或3倍长度的DNA（来源于功能化λDNA的过程中）。

［步骤 17］

**解决方法**：增加步骤 5 和步骤 11 的寡核苷酸的摩尔数和（或）增加步骤 6 和步骤 12 的溶液体积，稀释 λDNA。

**问题**：最终产物中没有寡核苷酸或半抗原。

［步骤 17］

**解决方法**：检查溶液的浓度、质量和纯化寡核苷酸（通过 PAGE、HPLC、MALDI 等）。化学合成寡核苷酸的过程中会产生截短的副产物是该反应的特征。因此，在实施实验方案前一定要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来纯化寡核苷酸，以除去被截短的产物。确保寡核苷酸的 5′端是磷酸化的。确保在每个退火步骤中离子强度大于 0.02 mol/L。因为在低离子强度下，DNA 的带负电的骨架会抑制寡核苷酸和 DNA 互补片段的配对。

## 讨论

上述实验方案提供了一种高效且可靠的特异地在 DNA 两端进行标记的方法。在 λDNA 每一端使用独特的标记（生物素和地高辛）的好处是能以相同取向使所有的 DNA 分子拴在表面与珠子之间。为了构造多种酶的底物，寡核苷酸序列可以产生很多变化（包括非特异配对的尾巴和发夹结构），虽然形成完整的双链结构 DNA 对后续的外切核酸酶，如 λ 外切核酸酶的实验是有用的。当然，使用这个方案可以利用 λDNA 作为起始的模板构建更多更复杂的 DNA。当使用未经本文讨论的寡核苷酸时，请使用寡核苷酸折叠软件来减少多余的二级结构，并减小与所需要的配对产生竞争的寡核苷酸之间的碱基对作用力。

## 实验方案4：用暗场显微镜对探针珠子宽场成像

基于散射光探测原理的暗场显微镜可以对大量的（>100）固定在DNA上的磁性珠子形成高对比度的宽场图像。在研究快速前进型的酶活动时，商售的装备有白炽灯和聚光器视场光阑的暗场显微镜就足够使用了。然而，慢速非前进型核酸酶活动的研究对机械稳定性的更高要求造成商售的暗场显微镜显得不合适。以下的实验方案详细描述了透过物镜的暗场成像系统的构建，用于要求增强机械稳定性的、时程长达数小时的慢速非前进型酶的研究。在这个实验方案中，照明光源是激光，物镜则作为聚光器。在上述系统中，我们能够很好地控制暗场显微镜的光学校准，并在时程长达数小时的研究中将长期稳定性降到10 nm。

### 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有<!>的材料。

设备

分光器（50∶50，Thorlab）
CCD照相机（如Coolsnap ES或Roper Scientific）
圆锥透镜（160°锥角，DelMar Ventures）
直流小马达（MicroMo Electronics）（可选，见步骤12）
DiaTrack软件（Semasopht）
$x$-$y$转换器上的视场光阑（ThorLabs）
毛玻璃散射器（ThorLabs）（可选，见步骤12和步骤13）
可变光阑（ThorLabs）
激光（氩，0.5～1 W，波长为514 nm，Coherent Innova）
透镜（1 in，BK7双凸透镜，Thorlab）
　焦距取决于实验安排。
镜筒（ThorLab）
MetaVue软件（Molecular Devices）
显微镜镜体（倒置，Axiovert 135，Zeiss）
反射镜（ThorLabs）
物镜（10×，孔径0.45，PlanApochromat，Zeiss）

### 方法

1. 将显微镜镜体装在牢靠的光学台上。
2. 将50∶50的分光器放置于显微镜的一个滤色块中。
3. 使用反射镜（如图21-4中的M1）将平行的激光校准使之直线射入显微镜，并使光线垂直射入物镜的顶板。

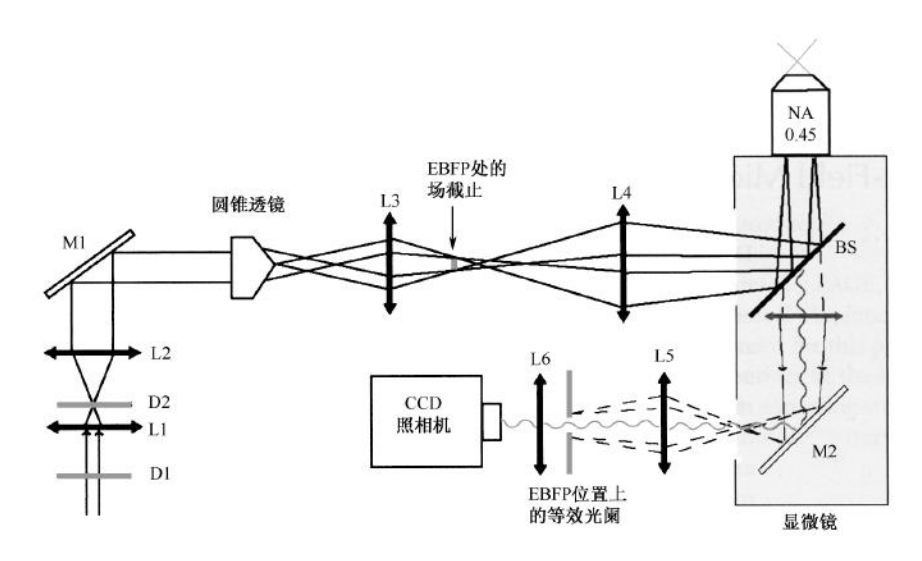



图 21-4　物镜暗场照明的光学装置。检测光路上的反射光和散射光分别用点线和曲线表示。L1～L6 为光学透镜；M1 和 M2 为反射镜；D1 和 D2 为散射器；EBFP 为等效后聚焦面，BS 为 50∶50 分光器。

4. 用两组透镜组成一个望远镜（图 21-4 中的 L1 和 L2）使校准过的激光束扩大至半径 5 mm。确保扩束后的激光按步骤 3 进行校准和调整。

   激光束将以与两组透镜的焦距相同比例扩束。

5. 利用圆锥透镜和另外两个透镜（图 21-4 中的 L3 和 L4）产生出作用在物镜后聚焦面的聚焦环状光。

   确保光环在后聚焦面的中心并和物镜的光圈大小相同，同时光线要以垂直方向射入顶板。

6. 在 L3 后放置视场光阑，该位置是环状光线首次聚焦（等效后聚焦面）的位置（见排疑解难）。

   视场光阑（装在 $x$-$y$ 转换器上直径约 8 mm 的圆盘）起到将光线变成纯粹环状光的作用，同时，如果使用了散射器，那么视场光阑对于形成环状光就是至关重要的。

7. 通过透镜 $x$-$y$ 转换器使视场光阑的位置在中心处。

8. 从显微镜镜体的输出端用镜筒制造探测光路。

   在镜筒中制造探测光路有助于减小房间照明系统产生的背景光。

9. 在照相机的原像平面附近放置一个透镜（图 21-4 中的 L5）。

   该透镜在显微镜外形成一个聚焦环状光（等效后聚焦面）。

10. 在等效后聚焦面处放置可变光阑。检验关闭光圈后是否能消除环状反射光线。

11. 在光圈后放置另一透镜（图 21-4 中的 L6），用来对作用于 CCD 上的散射光成像。

    L5 和 L6 的焦距将决定最终的放大率。

12. 为了达到在宽视场上形成均匀照明，排除相干光源造成的点干扰，可以在激光输出端加入一个旋转散射器（图 21-4 中的 D1）。

可以通过在直流马达上装载毛玻璃散射器自制一个旋转散射器。对于采样频率为 1 Hz的实验来说旋转速度约为 150 r/min 就足够快了。在旋转散射器旁装上遮护罩。

13. 为了得到更均匀的背景照明，可以在 L1 和 L2 之间加入一个静止的散射器（图 21-4 中的 D2）。

    额外加入的散射器会大大减少落在观察样品上的光强，因此，如果使用了静止散射器，那么就必须有强的光源。

## 排疑解难

**问题**：难以在等效后聚焦面上形成环状聚焦光线。

［**步骤 6**］

**解决方法**：圆锥透镜、L3 和 L4 的相对位置以及 L3 和 L4 的焦距对于在等效后聚焦平面上产生正确大小的环状光是十分关键的。可以按照我们的例子进行设置：在后聚焦面约 43 cm 处放置圆锥透镜，L3（焦距为 65～70 mm）放在离圆锥透镜 18 cm 处，L4（焦距为 75 mm）放在离 L3 大约 20 cm 处。以上设置会在后聚焦面上产生一个 12 mm直径的环状光。

## 讨论

物镜暗场照明的主要概念首先是由 Braslavsky 等（2001）提出的。对于使用 0.45 孔径（NA 0.45），10×物镜的单分子研究来说，我们对原始构造进行了改进。这个实验方案可以产生 1 mm×1 mm 视场的均匀暗场照明，并具有时程数小时的高机械稳定性（约 10 nm）。宽场成像系统允许在单个实验中对超过 100 个 DNA 的轨迹进行记录，机械稳定性减轻了因长期机械飘移（机械固定性偏差）产生的酶活动的观察误差更正的需要。此外，样品上的空间不再像商售暗场显微镜一样被聚光镜所占据。可以更简单地用磁铁或温度控制装置取代其放置在液流小室上。相比起宽场荧光显微镜来说，这个方案在实验室中较容易完成，并在磁珠成像的较长时程中不产生光漂白的问题。

# 实验方案 5：用功能化玻片制备液流小室

微流体流动小室对于流体动力施加在生物大分子上的模板牵拉力的成功、可靠地应用是必需的。此外，液流小室的存在简化了实验中缓冲液快速替换的过程。本实验方案详细描述了一种方便地利用功能化玻片和干净的显微镜载玻片间的黏附垫片形成液流小室的制备技术。接头和液流管至液流小室的封口处可用于换液。

## 材料

**注意**：参照本书附录，正确处理标有＜！＞的材料。

### 试剂

测定用缓冲液

选择对特定实验条件适用的测定用缓冲液。

封闭缓冲液

1 mg/ml 血清蛋白（BSA）

5 mmol/L EDTA

10%甘油

0.3 mol/L NaCl

0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.5）

0.1%鲑鱼精子 DNA（Sigma-Aldrich）

0.05%叠氮化钠＜！＞

0.1% Tween 20（聚山梨酸脂制剂的商品名）

DNA 模板（两端均被功能化）（见实验方案 3）

乙醇

蛋白质（荧光标记）（可选，见步骤 20）

链霉亲和素（用 10 mmol/L 的磷酸缓冲液配成浓度为 0.125 mg/ml 的溶液，pH 8.0）

用地高辛抗体功能化的超顺磁性珠子（见实验方案 2）

清洗缓冲液（50 mmol/L Tris pH 7.5 和 10 mmol/L NaCl）

过滤的去离子

### 设备

玻片（玻璃，由 PEG 或生物素功能化）（见实验方案 1）

钻头（吸头材料为钻石，孔径尺寸为 1.1 mm）

钻孔机（小型或手持的 Dremel 工具）

环氧树脂（快速固化的，如 5 min）

抹镜纸

显微镜载玻片（玻璃制，20 mm×55 mm×1 mm 规格）

针头（21 号）

过滤的氮气（或压缩空气）＜!＞
移液管吸头盒
移液管头
剃刀片
直尺
垫片（黏附的，厚 100 μm，Grace Bio Labs）
注射器（5 ml）
导管（聚乙烯，内径＝0.76 mm，外径＝1.22 mm，Intramedic，Clay Adams）
镊子

## 方法

1. 在离对角线两端 3～4 mm 处用钻头在显微镜载玻片上小心钻两个洞。

   在使用前用乙醇和抹镜纸将上面的尘埃除去。

   确保用水润滑钻头。
2. 将玻片从真空保存中取出。
3. 在干净的移液管吸头盒内放入玻片。在玻片功能化的那一面加入 0.2 ml 的链霉亲和素。
4. 盖上盒子。孵育至少 15 min。
5. 用刀片将垫片切割成和载玻片相同大小。
6. 用记号笔或刀片在垫片上对载玻片所钻的洞的位置做标记。
7. 在直尺或刀片帮助下于垫片内切出一块矩形。该矩形的宽度为 3 mm，长度等于两洞的距离。

   为了在特定容积流率下确保相同的流速，将流体通道切割成相同宽度是十分重要的。
8. 将垫片后的纸移去。小心地将垫片放在干净的载玻片上，使流体通路和两个洞连线在一条直线上。
9. 用干净的枪头将垫片和载玻片封合起来。如果必要的话，用刀片最后一次校准流体通道。
10. 用干净的镊子夹起玻片，用去离子水将链霉亲和素清洗干净。
11. 用氮气吹干玻片。以 PEG 功能化表面向上的方式放置在干净的表面上。
12. 移去垫片后的透明塑料。将玻片放在黏性表面，用枪头将两个面压牢。
13. 切割两根大约 12 in 长的聚乙烯管。

    管道口的末端不能被切割成平的（如和相对管线垂直的平面成 30°角），从而可以保证液流小室和管道接头处的液体交换。
14. 将两个切割完成的导管插入液流小室的两个洞中。

    将导管的顶部塑成竖直平面的形状有助于下一步加入树脂的时候保持稳定。
15. 加入快速固化的环氧树脂。在载玻片 4 个盖玻片（coverslip）突出的角上加上环氧树脂。同时，在聚乙烯导管和液流小室结合处加上环氧树脂。等待 10 min 让树脂固化。

16. 用注射器和针头注入清洗缓冲液冲洗液流小室。

在所有缓冲液替换的过程中，注意在液流小室和被固定的流动导管中被重力驱动的流体。要小心操作以避免将空气引入液流小室。一般来说，保持导管的两端在同一垂直高度或用针头封合末端对操作有力。

17. 用 500 μl 封闭缓冲液清洗液流小室。

上述步骤通过钝化表面减小液流小室表面对 DNA 和蛋白质/地高辛抗体珠子的吸附。

18. 在液流小室中注入模板 DNA（1 pmol/L）。室温下孵育 1 h 使生物素功能化的 DNA 分子和链霉亲和素作用的表面相连并在其上快速扩散。

上述孵育时间和 DNA 浓度的结合通常会产生适合单分子研究的表面 DNA 浓度（$10^4$～$10^5$ 分子/$cm^2$）。

19. 用合适的测定用缓冲液清洗掉 DNA 溶液。
20. 将液流小室装在显微镜载物台上。

如果使用探针珠子，请从步骤 21 开始操作。如果是结合 DNA 的荧光蛋白，请从步骤 25 开始操作。

## 有探针珠子的液流牵张力分析操作方法

21. 用含 20%封闭缓冲液的测定用缓冲液以 1∶200 的比例稀释地高辛抗体功能化的珠子原液。
22. 在流速约为 1 ml/h 的情况下将稀释的珠子引入液流小室。
23. 实时观察珠子固定在 DNA 上的情况。当有足够多的珠子固定上时，用不含珠子的测定用缓冲液清洗液流小室（见排疑解难）。

拴系珠子的 DNA 分子应该在这一步构建好，液流小室也相应地可以被用于实验。

24. 在恒定速率下先测量 DNA 被牵拉的长度，然后改变流体运动的方向在相同的容积流率下再测量一次。

## 有荧光探针的液流牵张力分析方法操作

25. 用测定用缓冲液清洗掉未被结合的 λDNA。

应选择能在样品蛋白质和 DNA 间产生最强结合的测定用缓冲液。

26. 注入荧光标记蛋白浓度为 1～1000 pmol/L 的溶液。

首次尝试时，在可接受的背景水平下使用最高浓度。

27. 调节激光的入射角，将样品稍微偏向全内发射临界角的透射面。调节激发光强使被研究的荧光团的发射速率饱和或接近于饱和。
28. 在信噪比可接受的程度下，以最快的采帧频率观察样品。
29. 通过聚焦于吸附在玻片表面的荧光蛋白来找出结合 DNA 的玻片面。
30. 通过调节激光的入射角来优化信噪比。
31. 通过寻找流体牵拉 DNA 上符合布朗运动的片段来确认结合 DNA 的蛋白质。

## 排疑解难

**问题**：珠子未能固定在 DNA 上。

［**步骤 23**］

**解决方法**：将一种核酸染料（如 Sytox）引入液流小室中，并尝试对有荧光标记的、固定于表面的 DNA 分子进行成像。如果在液流小室中存在 DNA 但是未能连接上珠子的话，要么是地高辛没有成功地整合进模板 DNA 中，要么是珠子没有被地高辛抗体功能化。又如果在液流小室内没有 DNA 的话，通过琼脂糖凝胶电泳和（或）紫外线/可见光吸光度来检测模板 DNA 原液的浓度。重新检查孵育条件［时间和（或）链霉亲和素的浓度和（或）模板 DNA 的浓度］。同样要对玻片功能化的条件进行检查。

**问题**：形成了珠子和 DNA 间的连接，但是长度不对。

［**步骤 23**］

**解决方法**：功能化 DNA 的表面浓度太高以至于多个 DNA 分子和一个珠子相连接。在孵育中减小孵育的时间和（或）DNA 的浓度。同样可以在 DNA 中加入嵌入型核酸染料来诊断该问题，该问题可以分为两种情况：DNA 长度是正常的但其在表面的浓度过高，或是其表面浓度正常但长度异常。

**问题**：地高辛抗体改造的珠子和（或）蛋白质不可逆地被玻片表面和液流小室壁吸附。

［**步骤 23**］

**解决方法**：增加原本数量相对较少的封闭缓冲液。将珠子引入液流小室前增加封闭缓冲液冲洗的步骤。

## 致谢

感谢 Antoine Van Oijen 在液流牵张力 DNA 分析方法上的原创性贡献。

### 参考文献

Abbondanzieri E.A., Greenleaf W.J., Shaevitz J.W., Landick R., and Block S.M. 2005. Direct observation of base pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438:** 460–465.

Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A., Verdine G.L., and Xie X.S. 2006. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **103:** 5752–5757.

Braslavsky I., Amit R., Ali B.M.J., Gileadi O., Oppenheim A., and Stavans J. 2001. Objective-type dark-field illumination for scattering from microbeads. *Appl. Opt.* **40:** 5650–5657.

Bustamante C., Macosko J.C., and Wuite G.J.L. 2000. Grabbing the cat by the tail: Manipulating molecules one by one. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1:** 130–136.

Cecconi C., Shank E.A., Bustamante C., and Marqusee S. 2005. Direct observation of the three-state unfolding of a single protein molecule. *Science* **309:** 2057–2060.

Deen W. 1998. *Analysis of transport phenomena*. Oxford University Press, New York.

Doyle P.S., Ladoux B., and Viovy J.-L. 2000. Dynamics of a tethered polymer in shear flow. *Phys. Rev. Lett.* **84:** 4769–4772.

Fernandez J.M. and Li H. 2004. Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **303:** 1674–1678.

Gore J., Bryant Z., Nollmann M., Le M.U., Cozzarelli N.R., and Bustamante C. 2006. DNA overwinds when stretched. *Nature* **442:** 836–839.

Graneli A., Yeykal C.C., Robertson R.B., and Greene E.C. 2006. Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1221–1226.

Ha T., Rasnik I., Cheng W., Babcock H.P., Gauss G.H., Lohman T.M, and Chu S. 2002. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature* **419:** 638–641.

Kim S., Blainey P.C., Schroeder C.M., and Xie X.S. 2007.

Multiplexed single molecule assay for weak enzymatic activity on flow-stretched DNA. *Nat. Methods* **4:** 397–399.

Kishino A. and Yanagida T. 1988. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334:** 74–76.

Lee J.B., Hite R.K., Hamdan S.M., Xie X.S., Richardson C.C., and van Oijen A.M. 2006. DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication. *Nature* **439:** 621–624.

Maier B., Bensimon D., and Croquette V. 2000. Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97:** 12002–12007.

Marko J.F. and Siggia E.D. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules* **28:** 8759–8770.

Schroeder C.M., Babcock H.P., Shaqfeh E.S.G., and Chu S. 2003. Observation of polymer conformation hysteresis in extensional flow. *Science* **301:** 1515–1519.

Schroeder C.M., Teixeira R.E., Shaqfeh E.S.G., and Chu S. 2005. Characteristic periodic motion of polymers in shear flow. *Phys. Rev. Lett.* **95:** 018301.

Smith S.B., Finzi L., and Bustamante C. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* **258:** 1122–1126.

Strick T.R., Croquette V., and Bensimon D. 2000. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* **404:** 901–904.

Strick T.R., Allemand J.F., Bensimon D., Bensimon A., and Croquette V. 1996. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271:** 1835–1837.

Strick T.R., Allemand J.-F., Bensimon D., and Croquette V. 1998. Behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.* **74:** 2016–2028.

Thompson R.E., Larson D.R., and Webb W.W. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **85:** 2775–2783.

van Oijen A.M., Blainey P.C., Crampton D.J., Richardson C.C., Ellenberger T., and Xie X.S. 2003. Single molecule kinetics of λ exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder. *Science* **301:** 1235–1238.

Wuite G.J.L., Smith S.B., Young M., Keller D., and Bustamante C. 2000. Single-molecule studies of the effect of template tension of T7 DNA polymerase activity. *Nature* **404:** 103–106.

（陆　文　译）

# 附录 警　示

## 一般警示

请注意本书附录的警告并不是详尽无遗的。读者应向厂商或别的途径咨询通用的及特殊的产品信息。在本部分提及的化学物质和其他材料并没有用实验方案中用来指示危险物品的图标所标识。但是，如操作不当也可能对使用者有害。请咨询当地实验室安全管理部门或从制造商的安全条例中获取进一步的信息。

始终留意以下通用警示。

• 在实验步骤开始前，应完全掌握所使用物质的性质。

• 没有警告并不意味着这个物质一定是安全的，因为信息并不总是充分或有效的。

• 如果接触了有毒物质；立即联系当地实验室安全管理部门获取指导。

• 对所有化学、生物、放射垃圾使用合适的方法处理。

• 对如何使用合适手套的特别指南，请咨询当地实验室安全管理部门。

• 小心处理高浓度酸碱。戴护目镜，使用合适的手套。当处理量大时，请使用面罩。

不要将强酸与有机溶剂混合，因为它们可能会产生反应。硫酸与硝酸尤其会引起放热反应并引发火灾或爆炸。不要将强碱与卤化试剂反应，它们会形成活性炭烯，引起爆炸。

• 小心处理存放加压气体的容器，因为它们可能储存了易燃、有毒、腐蚀性的气体，产生窒息的物质或氧化物。请查询商家提供的材料安全使用说明，获取合适的方法。

• 不要用嘴吸移取液体。这种方法是没有意义并且危险的。请使用移液器或吸耳球。

• 将卤化试剂与非卤化溶剂分开存放（如在碱存在的情况下，氯仿与丙酮混合会引起反应）。卤化溶剂是有机溶剂，如氯仿、二氯甲、三氯三氟代乙烷、三氯乙烷。非卤化溶剂，如戊烷、庚烷、乙醇、甲醇、苯、甲苯、DMF、DMSO 和乙腈。

• 看得见的或看不见的激光辐射对眼睛和皮肤会引起一定程度的伤害。采取合适的保护措施防止暴露于直接光或反射光。遵循制造商的安全条例并咨询当地实验室安全管理部门。参见后面的警示获取更详细的信息。

• 由于闪光灯的光强，它们可能会对眼睛造成伤害。它们有时可能会爆炸。佩戴合适的眼睛保护装置并遵循制造商的条例。

• 照相定影液、显影剂、感光树脂可能含有有害物质。小心处理它们并遵循制造商的指示。

• 电源和电泳装置，如使用不正确会引起火灾和触电。

• 实验室的微波炉和高压锅也需要一定的预防措施。有些事故也与它们的使用有

关，如溶化瓶中的琼脂或细菌琼脂，或者消毒处理等。当容器从微波炉或高压锅中拿出时，如果顶部的螺旋孔没有充分移开，蒸汽没有充分的空间排泄，瓶子会爆炸并引起伤害。在使用微波和高压前始终将瓶盖充分旋开。

• 超声发生器：将高频声波（10～100 Hz）用于细胞破碎或其他目的。空气传导的“超声波”不会对人体产生直接伤害，但伴随产生的大量的噪声会引起多种人体反应，包括头疼、恶心以及耳鸣。应该避免人体与高强度超声波的直接接触（不包括医学成像设备）。采用合适的方法保护耳朵，并且在使用该类仪器的实验室门上进行标记。

• 使用切割刀片和针头时应格外注意。包括超薄切片机刀片、手术刀片、剃刀刀片以及针头。超薄切片机刀片非常锋利！切片时应小心使用。如不熟悉此类器件的使用，请他人示范正确的使用方法。使用完毕，应丢弃在实验室内标记“锋利物”的特别垃圾箱中。使用过的针头丢弃时，应连接在注射器上，并且将针头套摘除。这样可以避免之后在处理用过的针头时发生伤害以及可能的感染（参见生物安全条例“生物安全”），因为在试图取下针头套时经常发生意外。此外，巴斯德管、玻片以及刀片断裂也容易引发意外。

• 动物处理：要长期监督检查对待动物是否符合人道原则。向当地机构咨询动物处理准则。像大鼠等动物会引起人体过敏，在重复暴露于过敏源时过敏症状会加剧。处理动物时应穿着实验服，并戴手套。如果对皮屑或唾液过敏，应使用面罩。

## 常见化学物质的一般性质

有害物质清单可以总结为如下类别。

• 无机酸，如盐酸、硫酸、硝酸，以及磷酸，均为有刺激性气味的无色液体。避免溅在皮肤及衣服上。使用大量的水稀释溅出的液滴。此类酸的浓缩液会损坏纸张、纺织品及皮肤，并且对眼睛造成伤害。

• 无机碱，如氢氧化钠，为白色粉末，可溶于水，在高温下溶化。浓缩液会缓慢溶解皮肤，甚至指甲。

• 重金属盐通常为有色，不溶于水的粉末状固体。大多数重金属盐为有效的酶抑制剂，因此对人体有毒，并且污染环境（如对鱼类和藻类有毒）。

• 大多数有机溶剂为易燃、易挥发液体。应避免吸入粉末，因其粉末会引起恶心或者晕眩。同样要避免皮肤接触。

• 其他有机化合物，包括有机硫黄化合物如巯基乙醇和有机胺类，具有臭味。其他有机化合物有很高的活性，使用时应小心。

• 如不恰当使用染色剂及其溶液，皮肤和衣服同样会被染色。其中有些染料具有诱变（如溴化乙锭）、致癌作用，以及具有毒性。

• 所有英文名后缀有“ase”的物质（如催化剂、β-葡萄糖苷酶）与酶有关。也有一些酶尚无系统命名，如胃蛋白酶。厂商提供的酶一般混合于缓冲物质中。需明确在这些物质中所含成分的性质。

• 有毒化合物常用于处理细胞。这些化合物可能会产生危险，因此要恰当使用。

• 如果被列出的某些化合物的毒性特征并没有研究清楚，在处理化学药物时应特

别注意。虽然化合物的毒性效应可以被量化（如 $LD_{50}$ 值），然而，对致癌物和诱导突变物此类单次暴露就能产生效应的有毒物质则不可能量化其毒性效果。此外化合物的危险性取决于它的物理状态（如细粉末和大块晶体，过氧化二乙基和丙三醇，干冰和压缩在毒气弹中的二氧化碳）。请了解在实验中何时会暴露于有毒环境，以及采用何种最佳方法保护自身以及环境。

## 危险物品

**注意**：总的来说，在此不包括资产性物质。也不包括试剂盒、其他的商业化物品以及大多数的麻醉剂、染料、固定剂和着色剂。对于麻醉剂还需要采取特殊的保管措施。以上提及的这些产品请遵守厂商的产品安全说明。

**acetic acid（glacial）**：**冰乙酸**，是高度腐蚀性物品，必须被非常小心地处理。它是潜在的致癌物。液状和气雾状能引起各种组织的严重燃烧。吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜，并且要在通风橱内进行操作。避免靠近热源、火花和明火。

**acetone**：**丙酮**，引起眼睛和皮肤刺激，并且刺激黏膜和上呼吸道。不要吸入蒸气。它是极易可燃物质。需要戴上合适的手套和护目镜。避免靠近热源、火花和明火。

**acetonitrile（methyl cyanide）**：**乙腈**，极易挥发，极易燃。它是一种刺激物和化学窒息剂，能通过吸入、摄取或者皮肤吸收的方式起作用。严重暴露情况下会引起氰化物中毒。必须要戴上合适的手套和护目镜，并且只能在通风橱内进行操作。避免靠近热源、火花和明火。

**Alconox detergent**：**Alconox 去污剂**，一种刺激物，如果被吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是有害的。需要戴上合适手套和护目镜操作。

**amino-phalloidin**：**氨基鬼笔环肽**，参见 **phalloidin**。

**3-aminopropyltriethoxysilane（TESPA）**：**3-氨丙基三乙氧基硅烷**，参见 **silane**。

**amino silane**：**氨基硅烷**，一种刺激物，能引起严重的角膜损伤。如果被吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是有害的。需要戴上合适手套和护目镜操作。避免与水接触。

**ammonium fluoride，NH4F**：**氟化铵**，剧毒，过度暴露可能是致命的。吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜，并且要在通风橱内进行使用。不能吸入粉末。避免长时间暴露。

**ammonium nitrate，$NH_4NO_3$**：**硝酸铵**，吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜，并且要在通风橱内进行操作。为了防止爆炸，要避免靠近热源、火花和明火。

**amyl acetate**：**乙酸戊脂**，参见 **isoamyl acetate**。

**argon**：**氩**，一种不可燃的高压气体。它被吸入、摄取或者皮肤吸收可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜。必须在通风状态下使用，并且不能吸入气体。

**arsenic**：**砷**，剧毒物，具有腐蚀性，还是一种致癌物。它被吸入、摄取或者皮肤吸收都可能是致命的。需要戴上合适手套和护目镜操作。不能吸入蒸气。

**bacterial strain（shipping of）**：**细菌菌株（及运输）**：健康教育和实验室安全管理部

门已经按照运输要求将各种细菌分为不同的类别。非致病菌的大肠杆菌（如 K12）和枯草杆菌属于第一类，在正常运输条件下被认为是无危险或者是极低危险的。然而，沙门氏菌和嗜血杆菌，以及某些链霉菌和假单孢菌属属于第二类，这类细菌是“常规的潜在危险菌类：它们能引起不同程度的严重疾病。但它被包含在常规的实验室技术”。参见 J. Y. Richmond 和 R. W. McKinney 1999 年编写的手册 *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories* (*BMBL*), $4^{th}$ ed. U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control at http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm。

**boric acid**, $H_3BO_3$：**硼酸**，吸入、摄取或者皮肤吸收可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜。

$CaCl_2$：**氯化钙**，参见 **calcium chloride**。

**calcium chloride**, $CaCl_2$：**氯化钙**，易吸水，可能会引起心血管失调。它被吸入、摄取或者皮肤吸收可能是有害的。不能吸入粉末。需要戴上合适的手套和护目镜。

$Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$：**硝酸铵化铈**，参见 **ammonium nitrate**。

**cerium ammonium nitrate**, $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$：**硝酸铵化铈**，参见 **ammonium nitrate**。

$CH_2Cl_2$：**二氯甲烷**，参见 **dichloromethane**。

**chrome**：**铬**，参见 **chromium**。

**chromium**, **Cr**：**铬**，一种刺激物，吸入、摄取或者皮肤吸收可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜。不能吸入粉末。

**chromium/nickel**：**铬/镍**，是极易燃烧的，有毒物，可能致癌。它被吸入、摄取或者皮肤吸收可能是有害的。需要戴上合适的手套和护目镜。不能吸入粉末。要避免靠近热源、火花和明火。要与你所在研究机构的实验室安全管理官员商量该物品的处理。

**concanavalin A**：**刀豆素蛋白 A**，具有毒性，长期暴露可能会产生致突变和畸变作用，可通过吸入、摄入或皮肤接触而带来有害作用。操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。

**Cy5-NHS ester**：**Cy5-NHS 酯**，有毒性，可通过吸入、摄食或皮肤接触而带来有害作用。操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。

**DAPI**：**4，6-联脒-2-苯基吲哚**，参见 **4，6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride**。

**DCM**：**二氯甲烷**，参见 **dichloromethane**。

**4，6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride**（**DAPI**）：**4，6-联脒-2-苯基吲哚**，可能具有致癌性，可通过吸入、摄食或皮肤接触而带来有害作用。它对人体有一定的刺激性，应避免吸入粉尘和蒸气。操作过程中应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。

**dichloromethane**（**DCM**），**CH2**$Cl_2$：**二氯甲烷**，也称**甲叉二氯**（**methylene chroride**），有毒性，可通过吸入、摄入或皮肤接触而带来有害作用。有刺激性，可能有致癌作用。操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。避免吸入蒸气。

**digoxigenin**：**地高辛**，吸入、摄入或皮肤接触后可能有致死作用。操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。避免吸入粉尘。

***N*，*N*-dimethylflormamide**（**DMF**），**HCON**（**$CH_3$**）**$_2$**：***N*，*N*-二甲基甲酰胺**，可能有致癌性，对眼镜、皮肤和黏膜有刺激性。在吸入、摄入或皮肤接触后会带来毒副作用。长期吸入会导致肝脏和肾脏的损伤。操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。

**dimethyl sulfoxide**（**DMSO**）：**二甲基亚砜**，吸入或皮肤接触后对人体有害，操作时应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。DMSO易燃，应保存在密封罐里，并远离热源、火花和明火。

**dithiothreitol**（**DTT**）：**二硫代苏糖醇**，一种强还原剂，有恶臭味。吸入、摄入或皮肤接触后对人体有害，当使用固态DTT或高浓度储存液时，应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。

**DMF**：***N*，*N*-二甲基甲酰胺**，参见 ***N*，*N*-dimethylflormamide**。

**DMSO**：**二甲基亚砜**，参见 **dimethyl sulfoxide**。

**DTT**：**二硫代苏糖醇**，参见 **dithiothreitol**。

**dye**：**染料**，遵守产商的安全指南。

**EDAC**：**1-乙基-3-**（**3-二甲氨基丙基**）**碳二亚胺盐酸盐**，参见 **1-ethyl-3-**（**3-dimethylaminopropyl**）**carbodiimide**，**hydrochloride**。

**epoxy and acrylic resin**：**环氧树脂或丙烯酸树脂类**，参见 **resin**。

**ethanolamine**，**$HOCH_2CH_2NH_2$**：**乙醇胺**，吸入、摄入或皮肤接触后对人体有毒害作用，应谨慎操作，避免一切与皮肤的直接接触。应戴上耐磨手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。乙醇胺具有高度腐蚀性，能和酸发生剧烈反应。

**1-ethyl-3-**（**3-dimethylaminopropyl**）**carbodiimide**，**hydrochloride**（**EDA**，**EDAC**，**EDCI**）：**1-乙基-3-**（**3-二甲氨基丙基**）**碳二亚胺盐酸盐**，对黏膜和上呼吸道有刺激作用，吸入、摄入或皮肤接触后对人体有毒害作用，操作时戴上手套和护目镜，应谨慎操作。

***N*-ethyl-3-**（**3-dimethylaminopropyl**）**-*N*′-carbodiimide**，**hydrochloride**：***N*-乙基-3-**（**3-二甲氨基丙基**）**-*N*′-碳二亚胺盐酸盐**，参见 **1-ethyl-3-**（**3-dimethylaminopropyl**）**carbodiimide**，**hydrochloride**。

**formaldehyde**，**HCHO**：**甲醛**，具有高度毒性，易挥发，可能有致癌作用。可能通过皮肤接触被人体吸收，对眼镜、皮肤黏膜和上呼吸道带来刺激性或破坏性作用。操作时避免吸入，并戴上合适手套及护目镜，并在化学通风橱中进行，远离热源、火花和明火。

**glucose oxidase**：**葡萄糖氧化酶**，吸入、摄入或皮肤接触后对人体有毒害作用，操作时戴上合适手套及护目镜。

**gold particles**，**streptavidin-conjugated**：**链霉亲和素偶联的金颗粒**，具有高度毒性。加热后易爆，与酸接触后释放有毒气体。在吸入、摄入或皮肤接触后对人体有毒害作用，操作时应戴上合适手套及护目镜，并在化学通风橱中进行。也请参见 **sodium azide**。

**$H_3BO_3$**：**硼酸**，参见 **boric acid**。

**$H_3COH$**：**甲醇**，参见 **methanol**。

**HCl**：**盐酸**，参见 **hydrochloric acid**。

**$HClO_4$**：**高氯酸**，参见 **perchloric acid**。

**$HCON(CH_3)_2$**：**二甲基甲酰胺**，参见 ***N*，*N*-dimethylflormamide**。

**1-hexadecene**：**十六烯**，有刺激性，吸入、摄入或皮肤接触后可能对人体有害，操作时应戴上合适手套及护目镜，避免吸入蒸气，并远离热源、火花和明火。

**hexane**：**己烷**，极其易燃，在吸入、摄入或皮肤接触后可能对人体有害，操作时应戴上合适手套及护目镜，并在化学通风橱中进行，远离热源、火花和明火。

**$HNO_3$**：**硝酸**，参见 **nitric acid**。

**$H_2O_2$**：**过氧化氢**，参见 **hydrogen peroxide**。

**$HOCH_2CH_2SH$**：**β-巯基乙醇**，参见 **β-mercaptoethanol**。

**$H_2SO_4$**：**硫酸**，参见 **sulfuric acid**。

**hydrochloric acid**，**HCl**：**盐酸**，易挥发，吸入、咽下或通过皮肤吸收均具有致命性。对黏膜、上呼吸道、眼和皮肤具有极强的破坏性。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，在化学通风橱中小心操作。当处理大量盐酸时佩戴护目镜。

**hydrogen peroxide**，**$H_2O_2$**：**过氧化氢**，具有腐蚀性、有毒，对皮肤具有极强的伤害。吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，并且只能在化学通风橱中操作。

***N*-hydroxysuccinimide**：***N*-羟基丁二酰亚胺**，具有刺激性，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜。

**6-hydroxy-2，5，7，8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid**，**Trolox**：**水溶性维生素 E**，具有刺激性，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜。勿吸入粉末。

**imidazole**：**咪唑**，具有腐蚀性，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，并且在化学通风橱中操作。

**isoamyl acetate**：**乙酸异戊酯**，具有易燃性和刺激性。如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜。勿呼吸其蒸气或雾状物。操作时远离热源、火花和明火。

**KCl**：**氯化钾**，参见 **potassium chloride**。

**KOH**：**氢氧化钾**，参见 **potassium hydroxide**。

**laser radiation**：**激光辐射**，包括可见光和不可见光，根据使用激光的等级，能严重损害眼睛和皮肤并可导致空气污染。高能量激光能够导致眼睛永久性伤害、灼伤暴露的皮肤、点燃可燃性物质以及激活有毒化学物释放危险的副产品。避免眼睛和皮肤直接或间接暴露在射线下。不要目视激光或将激光指向任何人。穿戴合适的眼睛保护物和适当的防护物，此防护物设计适用于对所用的特定波长、运转模式（连续式或脉冲式）、输出功率（瓦）的激光提供保护。还有一些非光束伤害包括电死、失火和窒息。进入使用激光的区域必须有约束和警示标志提醒正在使用激光。时刻遵循设备中附加的建议安全守则和联系当地安全部门以获取进一步的信息。

**ion laser**：**离子激光器**，由于其高电压高电流能量供给导致了危险性。始终遵循制造商建议的安全守则。

**ultraviolet laser**：**紫外线激光器**，由于其不可见和高能量辐射导致其危险性。始终使用电子束阱、散射光护罩和荧光寻束卡。

**blue-green laser**：**蓝绿激光器**，由于其光热凝结导致其危险性。蓝光和绿光容易被血液中血色素吸收。

**liquid nitrogen**（**$LN_2$**）：**液氮**，由于其极低的温度可导致严重的伤害。尽量谨慎处理冷冻样本。勿吸入其蒸气。从液氮中取出时渗入冷冻小瓶的液氮会导致小瓶爆裂。如可能请使用带 O 型环的小瓶。穿戴防寒手套和面具。勿将液氮溅在衣物上。

**$LN_2$**：**液氮**，参见 **liquid nitrogen**。

**magnesium chloride**，**$MgCl_2$**：**氯化镁**，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，并且在化学通风橱中操作。

**magnesium sulfate**，**$MgSO_4$**：**硫酸镁**，呈现慢性健康危害，影响中枢神经系统和肠胃道。如不慎吸入、咽下或皮肤吸收可能引起伤害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，并且在化学通风橱中操作。

**magnets**，**rare earth**：**磁铁**，**稀土元素**，有很强的磁力。它们能够损害电子设备、计算机、信用卡以及其他磁性物质。

**maleimide**：**马来酰亚胺**，有剧毒，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收可能致命。勿吸入其粉尘。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜，并且在化学通风橱中操作。

**MeOH**：**甲醇**，参见 **methanol**。

**2-mercaptoethanesulfonic acid sodium**（**MESNA**）：**2-巯乙基磺酸钠**，是一种刺激物，如不慎吸入、咽下或皮肤吸收均有害。建议操作人员佩戴合适的手套和安全眼镜。只能在化学通风橱中操作。勿吸入其灰尘、蒸汽或雾状物。

**β-mercaptoethanol**（**2-Mercaptoethanol**），**$HOCH_2CH_2SH$**：**β-巯基乙醇**（**2-巯基乙醇**），如果吸入或通过皮肤吸收可能会致命，如果消化也会有害。高浓度尤其会破坏黏膜、上呼吸道、皮肤和眼睛。β-巯基乙醇味道很臭。应该在化学通风橱里使用并戴上手套和安全眼镜。

**MES**：**乙磺酸**，参见 **2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid**。

**MESNA**：**2-巯乙基磺酸钠**，参见 **2-mercaptoethanesulfonic acid sodium**。

**methanol**，**MeOH** 或 **$H_3COH$**：**甲醇**，有毒，会引起失明。吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。充分的通风对于减少暴露于甲醇蒸气是必要的。避免吸入这些蒸气并且在化学通风橱中戴着手套和安全眼镜来操作甲醇。

**methyl cyanide**：**氰化甲烷**，参见 **acetonitrile**。

**methylene chloride**：**二氯甲烷**，参见 **dichloromethane**。

**$MgCl_2$**：**氯化镁**，参见 **magnesium chloride**。

**$MgSO_4$**：**硫酸镁**，参见 **magnesium sulfate**。

**2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid**（**MES**）：**乙磺酸**，吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。戴着手套和安全眼镜来操作。

**$Na_2CO_3$**：**碳酸钠**，参见 **sodium carbonate**。

**$NaN_3$**：**叠氮钠**，参见 **sodium azide**。

**NaOH**：**氢氧化钠**，参见 **sodium hydroxide**。

**$NH_4F$**：**氟化铵**，参见 **ammonium fluoride**。

**$NH_4NO_3$**：**硝酸铵**，参见 **ammonium nitrate**。

**Ni-NTA resin**：**Ni-NTA 树脂**，参见 **resin**。

**nitric acid**，**$HNO_3$**：**硝酸**，挥发性的酸，要小心操作。吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。应该在化学通风橱里使用并戴上手套和安全眼镜。不要吸入蒸气，远离热源、火花和明火。

**nitrogen**（**gaseous 或 liquid**）：**氮气**（**气态或液态**），吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。应戴手套和安全眼镜操作。咨询当地的实验室安全管理部门。

**PEI**：**聚乙亚胺**，参见 **polyethylenimine**。

**perchloride acid**，**$HClO_4$**：**高氯酸**，易爆的且高腐蚀性的。它会对黏膜、上呼吸道、眼睛和皮肤造成严重烧伤和腐蚀。戴好手套和护目镜，在化学通风橱中使用。

**phalloidin**：**鬼笔菌素**，毒性极强，可能通过呼吸、消化道和皮肤吸收致死。用这些化合物要千万小心。戴好手套和护目镜，在化学通风橱中使用。如果皮肤有伤口就不要操作。

**phalloidin**，**CPITC-labeld**：**CPITC 标记的鬼笔菌素**，见 **phalloidin**。

**phalloidin**，**FITC-labeld**：**FITC 标记的鬼笔菌素**，见 **phalloidin**。

**phalloidin**，**TRITC-labeld**：**TRITC 标记的鬼笔菌素**，见 **phalloidin**。

**photographic fixative**，**developers**，**and photoresists**：**照相定影液、显影液和感光树脂**，也包含有害化合物。小心操作并服从制造商的指导。

**piranha solution**：**水虎鱼溶液**，含硫酸和过氧化氢。它毒性很高尤其破坏黏膜、上呼吸道、眼睛和皮肤。它会造成烧伤，并且接触其他物质会起火（如纸）。戴上手套、护目镜，穿实验服，使用化学通风橱。咨询你所在地的实验室安全管理部门如何使用和处理这种物质。

**PMMA**：**聚甲基异丁烯酸盐**，参见 **poly**（**methyl methacrylate**）。

**polyethylenimine**（**PEI**）：**聚乙亚胺**，会引起眼睛和皮肤烧伤。吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。戴着手套和安全眼镜来操作。

**poly**（**methyl methacrylate**）（**PMMA**）：**聚甲基异丁烯酸盐**，是潜在的致癌物质。吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。戴着手套和安全眼镜来操作。不要吸入粉尘。

**potassium chloride**，**KCl**：**氯化钾**，吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。戴着手套和安全眼镜来操作。

**potassium hydroxide**，**KOH 和 KOH/methanol**：**氢氧化钾及氢氧化钾/甲醇**，高度毒性，吞下可能致命。吸入、消化或皮肤吸收都可能有害。溶液是腐蚀性的，而且可能造成烧伤。需要小心操作。戴着手套和安全眼镜来操作。

**propane**：**丙烷**，是易燃的，高压的液体和气体可能与空气混合爆炸。蒸气可能传播很远的距离至火源并爆炸。使之远离热源、火花和明火。戴着手套和安全眼镜并使用机械排气。

**resin**：**树脂**，是易燃的并被怀疑是致癌物质。没有聚合的成分和粉尘可能引起中毒反应，包括长时间暴露后的接触性过敏。避免呼吸蒸汽和粉尘。戴好手套和护目镜，在化学通风橱中使用。反复接触会增加对这些物质的敏感度。远离热源、火花和明火。

**sigmacote**：**甲硅烷**，参见 **silane**。

**silane**：**甲硅烷**，高度可燃和强腐蚀性。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。

远离热源、火花和明火。挥发会对眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道带来刺激。要戴合适的手套和安全护目镜并在化学通风橱中进行操作。

**sodium azide，$NaN_3$：叠氮钠**，强毒性。阻断细胞色素电子转运系统。含有叠氮钠的溶液应该被清楚的标记。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜并非常小心地进行操作。叠氮钠是一种氧化剂不能储存在靠近易燃化学物质的地方。

**sodium carbonate，$Na_2CO_3$：碳酸钠**，吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜并在化学通风橱中进行操作。

**sodium hydroxide，NaOH 和 solutions containing NaOH：氢氧化钠及氢氧化钠溶液**，强毒性和强腐蚀性并要非常小心的进行操作。要戴合适的手套和面罩。以相同的策略处理其他浓碱。

***Staphylococcus aureus*（*S. aureus*）：金黄色葡萄球菌**，参见 **bacterial strain**。

**streptomycin：链霉素**，有毒并且是可疑的致癌物和诱变剂。它有可能引起过敏反应。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜。

**sulfuric acid，$H_2SO_4$：硫酸**，强毒性并对黏膜和上呼吸道组织、眼睛和皮肤有严重的破坏性。它可以引起灼伤，与其他材料接触（如报纸）可能会引起火灾。要穿戴合适的手套、安全护目镜和实验服并在化学通风橱中进行操作。

**taxol：紫杉酚**，可能对胎儿有害。经常性的暴露可能会影响骨髓、外周神经系统、胃肠道和呼吸系统。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜。使用生物安全柜来配制这种药物。

**TCEP：磷酸三氯乙酯盐酸**，参见 **Tris-(carboxyethyl) phosphine hydrochloride**。

**TESPA，甲硅烷**，参见 **silane**。

**tetramethylrhodamine isothiocyanate（TRITC）：四乙基若丹明异硫氰酸盐**，吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜。

**TFA：三氟乙酸**，参见 **trifluoroacetic acid**。

**trifluoroacetic acid（TFA）（concentrated）：浓缩三氟乙酸**，吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要非常小心的处理浓缩的酸。分解会产生有毒的烟尘。要戴合适的手套和面罩并在化学通风橱中进行操作。

**Tris-(carboxyethyl) phosphine hydrochloride（TCEP）：磷酸三氯乙酯盐酸**，对黏膜、上呼吸道、眼睛和皮肤有腐蚀性并能引起灼伤。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜并在化学通风橱中进行操作。不要吸入气雾。

**TRITC：四乙基若丹明异硫氰酸盐**，参见 **tetramethylrhodamine isothiocyanate**。

**Triton X-100**：一种去污剂，会引起严重的眼部刺激和灼伤。吸入、吞下或皮肤吸收可能会带来伤害。要戴合适的手套和安全护目镜。不要吸入蒸气。

**trolox：6-羟基-2，5，7，8-四甲基色烷-2-羧酸**，参见 **6-hydroxy-2，5，7，8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid**。

**UV light 和（或）UV radiation：紫外光或紫外辐射**，是危险的并会损害视网膜。不要用裸眼看没有被防护的紫外光源。在实验室常见的紫外光源有手提式的弧光灯和透照灯。只能通过能吸收有害波长的滤镜或安全护目镜来观察。紫外线还是诱变和致癌

的。为了减少暴露，要确保紫外光源足够的被防护。当在紫外光源下手持材料时要戴合适的防护手套。

**viruses**：**病毒**，可能会引起特定的危害，所有操作的研究人员都推荐去咨询当地的实验室安全管理部门和参考由 J. Y. Richmond 和 R. W. McKinney 1999 年主编的手册 *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories* (*BMBL*), 4th ed. U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control at http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm。

# 索　　引

# 图　　版

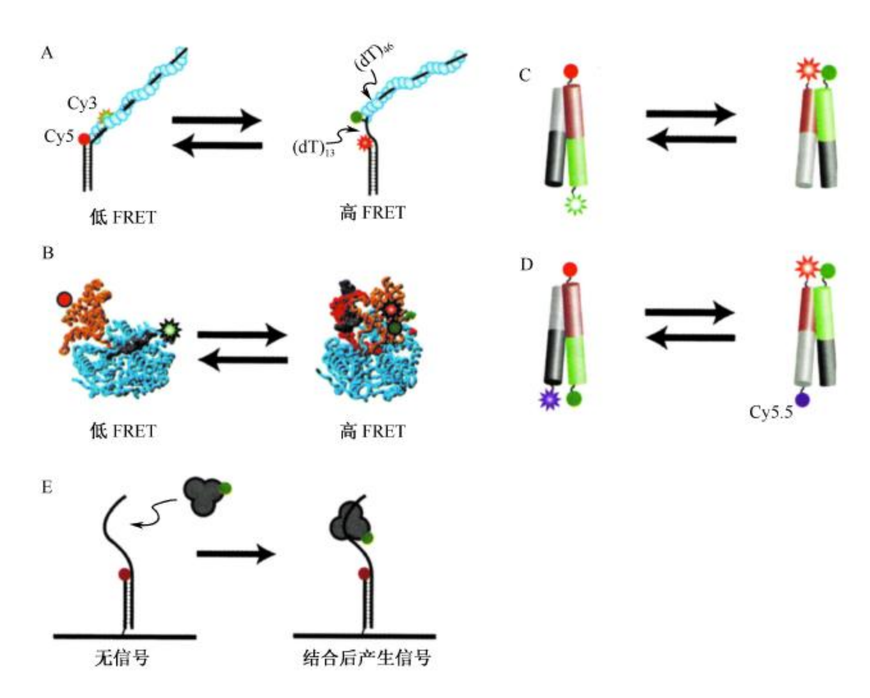



图 2-4　样本标记。A. Cy3 和 Cy5 的放置方式不同，它们的距离不同，长于 $R_0$（左图）或短于 $R_0$（右图）（Joo et al. 2006）。B. 根据蛋白质两种构象的 X 射线晶体结构来选择两个染料的定位。因此，它们被两种不同的 FRET 状态所区分（Myong et al. 2005）。C、D. 用两种不同的 FRET 状态看见一个四通接头的两种不同构象，其中 C 图是一个常用的两色体系，D 图是一个三色体系。在三色体系中，Cy5 和 Cy5.5 在两种构象中都被很好地分开；因此，它们之间的 FRET 可以被忽略（Hohng et al. 2004a）。E. 当一个标记了受体的 DNA 分子被固定时，只有当供体标记的分子与 DNA 结合，才能观察到 FRET 信号。

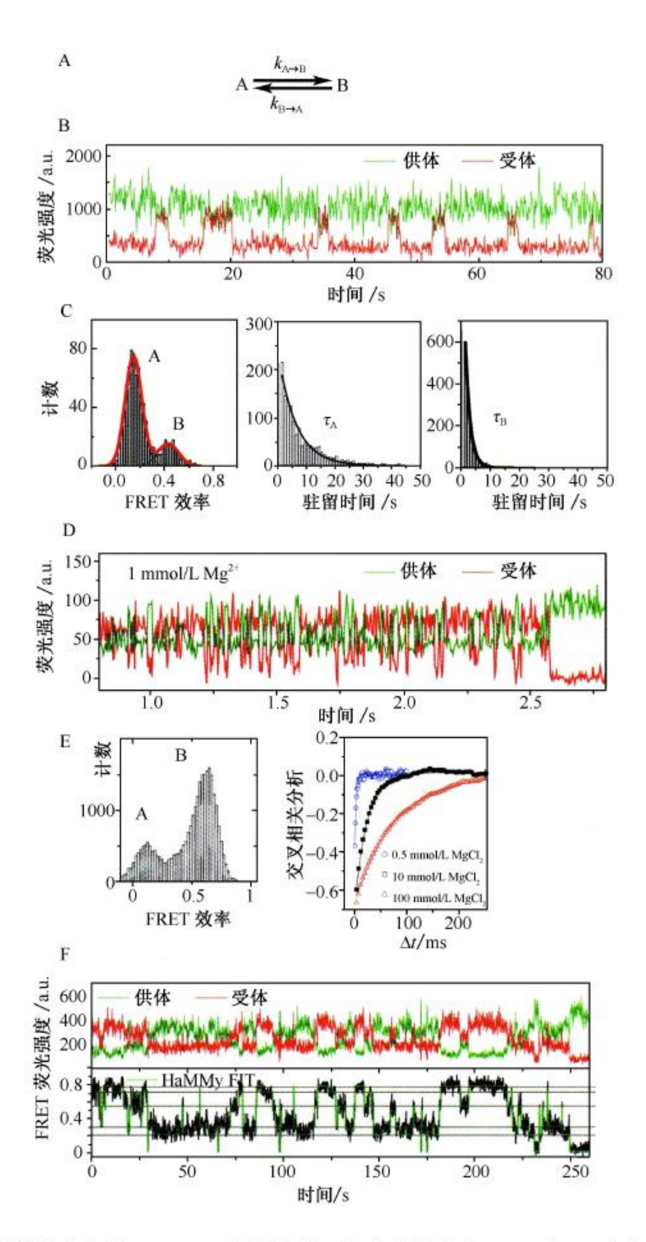



图 2-6　平衡下的构象动力学。A. B～E 图列出的双态动力学图示。B. 一个 sm 追踪显示高 FRET 和低 FFET 的两种状态之间的波动。供体信号（绿色）与受体信号（红色）是不相关的（Hohng et al. 2004a）。C. 左图由 B 图中是数据得到的 FRET 柱状图，右侧两幅显示了低 FRET 和高 FRET 状态的停顿时间（dwell time）分布。$\tau_A$ 等于 $1/k_{A\to B}$，$\tau_B$ 等于 $1/k_{B\to A}$。D. 当两种状态波动太快时，很难用停顿时间分析，因此，采用交叉相关分析方法（Joo et al. 2004）。E. 左图是由 D 图中数据得到的 FRET 柱状图，右图是在不同盐浓度下受体和供体时间追踪的交叉相关分析。F. 当存在两种以上的状态［这里有 6 种，包括受体的光闪烁（photoblinking）］，数据分析需要用更高级的运算方法，如隐匿马尔可夫模型。在 FRET 示踪上的拟合（绿线）是用的隐匿马尔可夫模型分析（Joo et al. 2006）。

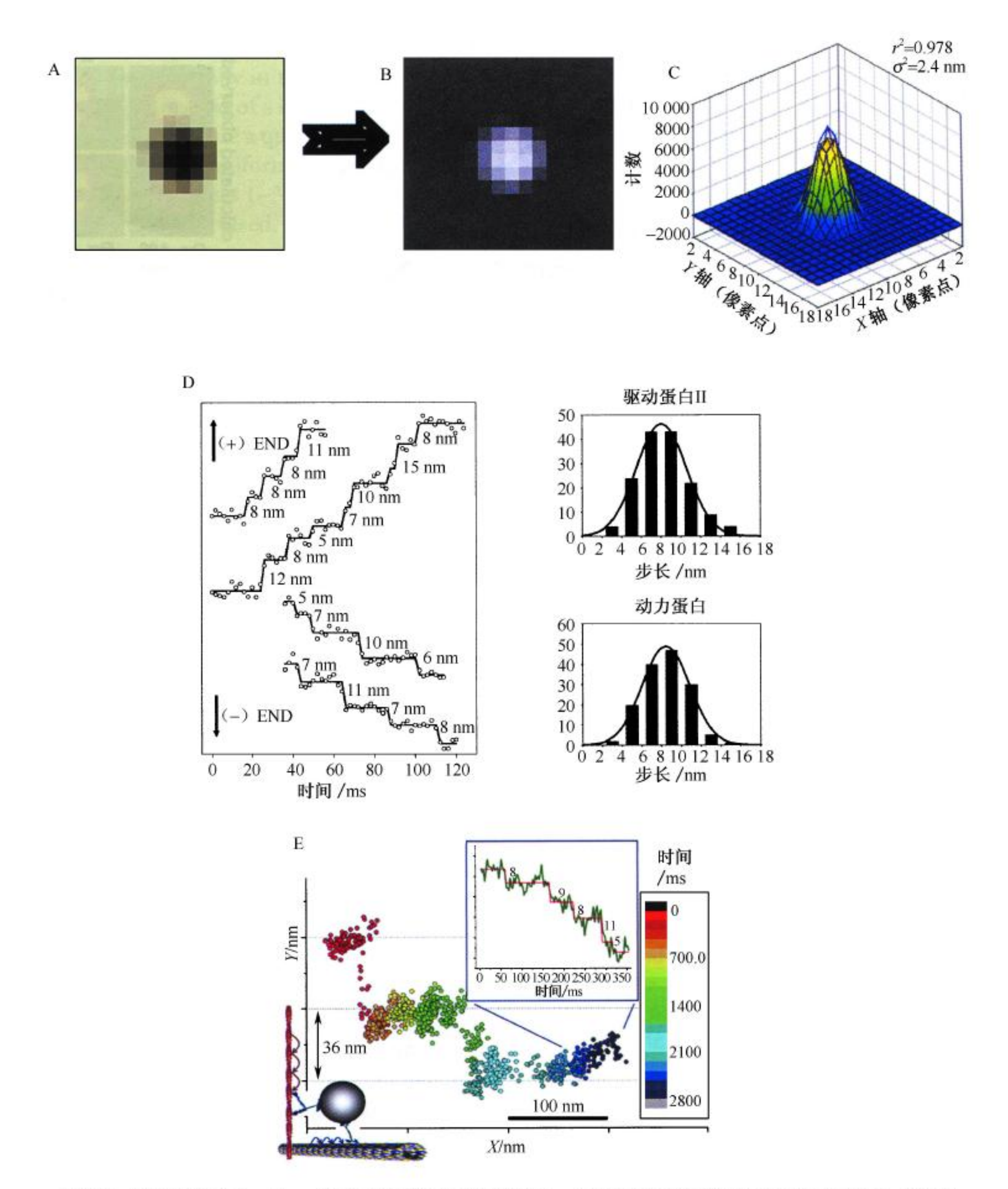



图 3-8 明场 FIONA。A. 一个黑色素体的明场成像图。注意到黑色素体要比周围的背景具有更低的光子数；B. 为了拟合成高斯曲线，黑色素体图像被倒转；C. 一幅高斯拟合的倒转黑色素体图像，图心定位在 2.4 nm；D. 通过对黑色素体运动成像来显示驱动蛋白和动力蛋白的步移轨迹，右侧是一个驱动蛋白和动力蛋白步长的直方图；E. 单个步移轨迹显示黑色素体先有一个 36 nm 的步移随后接一个 8 nm 的步移，这意味着黑色素体先是由肌球蛋白介导的运动，随后切换到由驱动蛋白和动力蛋白介导的运动。

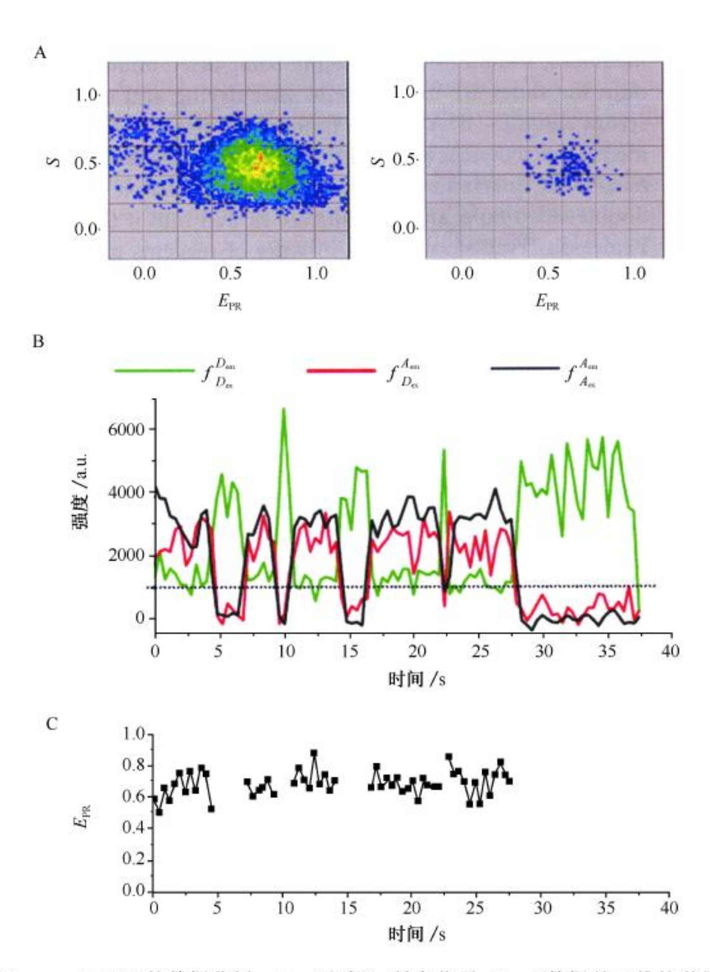



图 5-10　ms-ALEX 的数据分析。A.（左侧）所有分子 $E_{PR}$-$S$ 数据的二维柱状图，在所有时间点上。只有受体和供体荧光团都有活性的点才被选择。（右侧）对于每个分子，平均的 $E_{PR}$ 和 $S$ 都计算并显示了。B. 单分子 $f_{D_{ex}}^{D_{em}}$（绿色）、$f_{D_{ex}}^{A_{em}}$（红色）和 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$（黑色）的时间轨迹。$f_{D_{ex}}^{D_{em}}$ 和 $f_{D_{ex}}^{A_{em}}$ 的反相关行为来自受体的闪烁（见 $f_{A_{ex}}^{A_{em}}$ 时间轨迹）。C. B 图中一个分子的 $E_{PR}$ 轨迹，没有接受体闪烁。

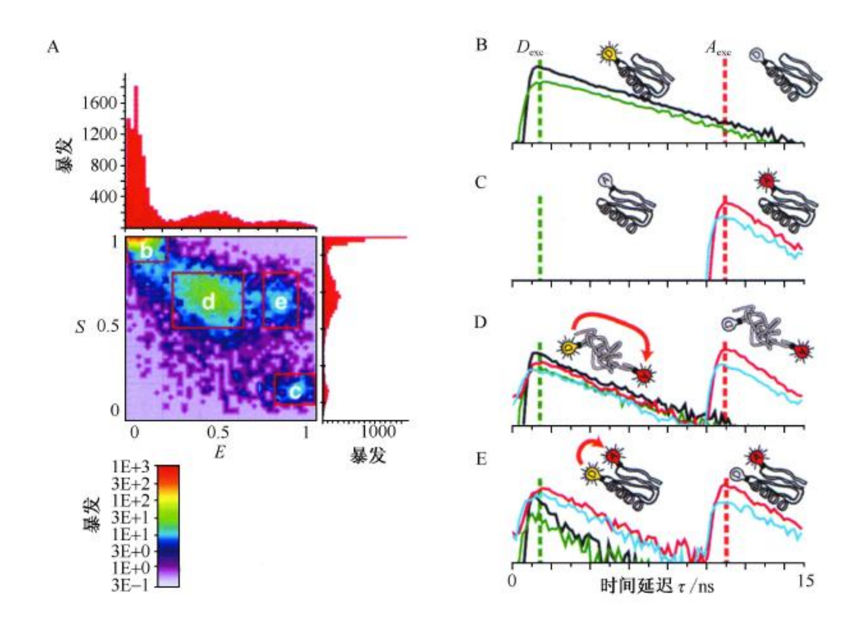



图 5-13　*E-S* 柱状图和不同亚群 ns-ALEX 荧光强度衰减。黑色和绿色的衰减代表供体发射，分别平行和垂直于激发的偏振。红色和橙色衰减代表受体发射，分别平行和垂直于激发的偏振。A. ns-ALEX 得到的 *E-S* 柱状图。B～E. 来自只有供体的荧光强度衰减（B），只有受体（C），低 FRET 的供体受体复合物（D），FRET 高的供体受体复合物（E）。

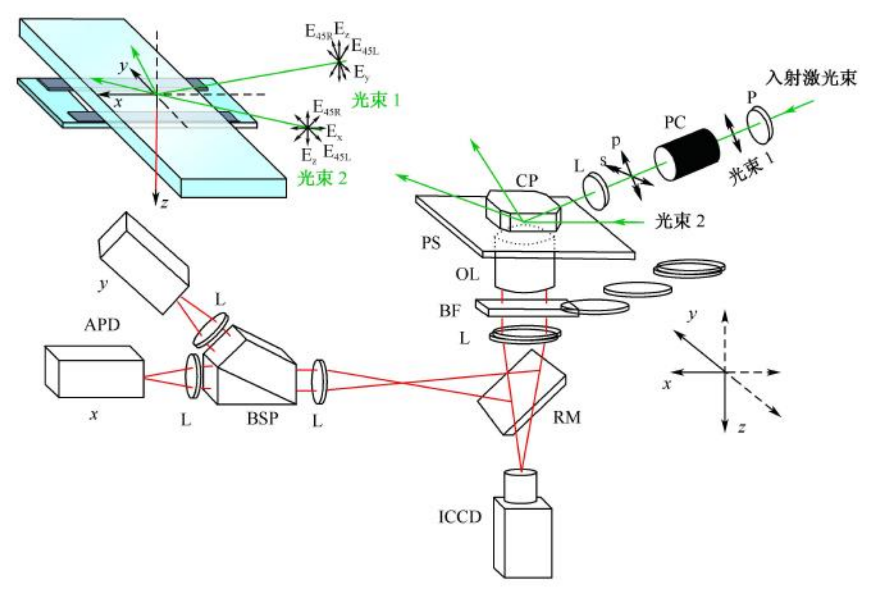



图 6-3　polTIRFM 试验设备。输入激光束（绿色）可以选择沿着光路 1 和 2 的方向。对于每个光路，光束经过一个线性偏振器（P）和一个电光调制盒（PC）产生可选择的平行于和正交于相关反射平面的线性偏振光（p 和 s）。通过耦合棱镜（CP）及折射率匹配液，光束被耦合进入石英显微镜载玻片。在石英/水界面上，全内反射发生，将光束通过耦合石英棱镜折回入一个束流收集器（图中没有显示）。石英载玻片（左上角）固定在一个压电载物台上（PS）。荧光（红色）由显微镜物镜（OL）搜集，经过带通滤色块（BF）并由透镜（L）成像。根据可移动反射镜（RM）的位置，荧光可成像在增强型 CCD 相机（ICCD）上或通过 Thompson 分束偏光棱镜（BSP）成像在两个雪崩光电二极管（APD）上。流量开关依据这两个光路定向（左上角）。

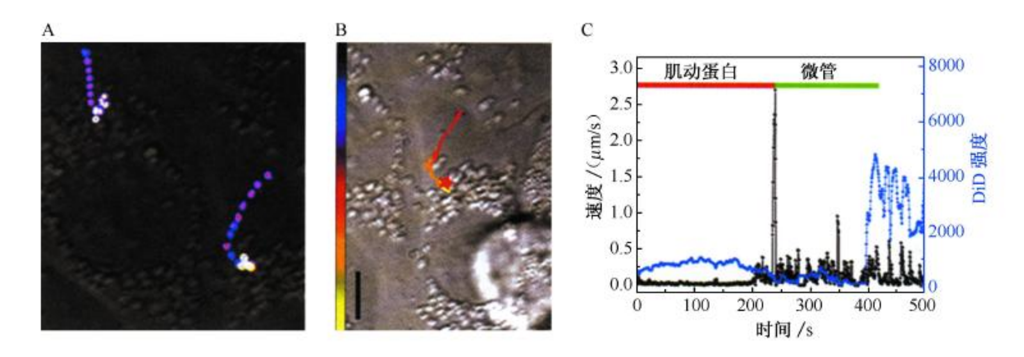



图 8-4　在活细胞中流感病毒的转运和融合。流感病毒外衣被足够高密度的标上了 DiD 以至于来自每个染料的荧光部分被淬灭。病毒与内体的融合导致了荧光强度的明显升高，这是因为 DiD 分子扩散到更大的内体膜中去了。A. 在活的中国仓鼠卵细胞（CHO）中的两个流感病毒的层叠的、随时间流失的图像。从蓝色/粉红色到黄色/白色快速颜色的改变表明了一次剧烈的荧光去淬灭，即病毒与内体的融合。B. 其中一个病毒的物理运行轨迹。这个轨迹用颜色来代表时间，旁边的颜色校准条表明了 0（黑色）～500 s（黄色）的一个一致的时间轴。红色的星形表示融合的时间。条的尺寸为 10 μm。C. 病毒速度（黑色）和 DiD 荧光强度（蓝色）的时间轨迹。结合使肌动蛋白丝和微管解聚的药物实验，我们发现病毒颗粒在细胞外周缓慢运动是肌动蛋白依赖的，而在或向细胞核周快速运动是微管依赖的（引自 Lakadamvali et al. 2003）。

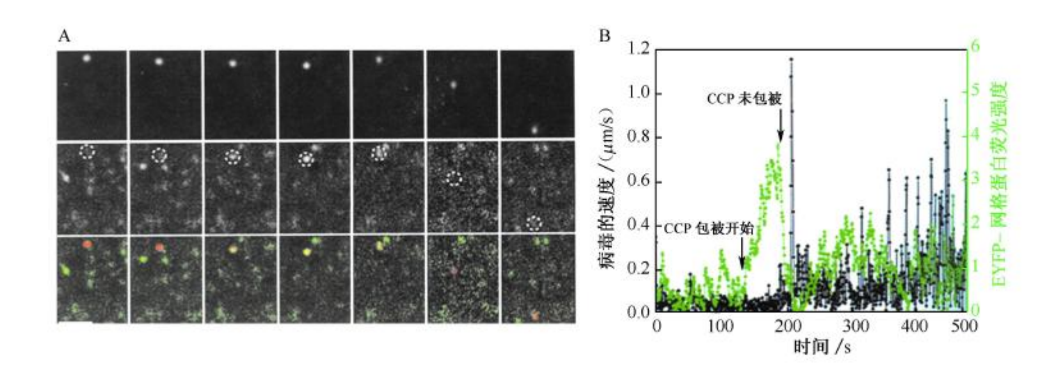



图 8-5　流感病毒通过网格蛋白包裹的陷阱（CCP）内化。A. 在 BS-C-1 活细胞中对 DiD-标记的病毒（上图和下图中的红色）和 GFP 标记的网格蛋白（中图和下图中的绿色）的快照显示了病毒通过 CCP 的内化。在中图中虚线圈的中心是病毒的位置。红色和绿色信号的叠加产生了黄色。横线长 10 μm。B. 另外一个病毒颗粒通过新生的 CCP 而内化的时间轨迹。黑色代表病毒的速度时间轨迹。高速的运动是微管依赖的。绿色代表与病毒相关的带有 EYFP 的网格蛋白的整合荧光强度（引自 Rust et al. 2004）。

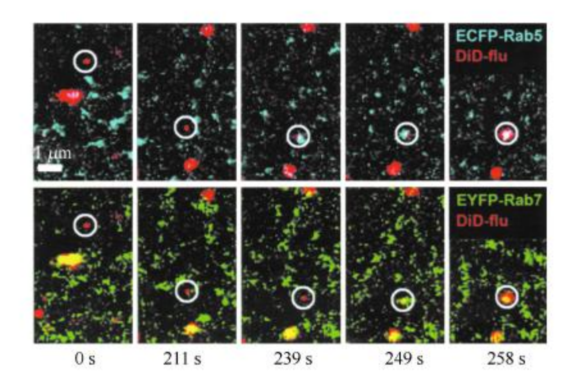



图 8-6　在运动的内体中流感病毒颗粒的转运和融合。流感病毒以可以产生淬灭的密度标记 DiD，这样病毒与内体的融合就可以通过荧光反淬灭而显现出来。早期内体的标记物 Rab5 被标记上 ECFP，晚期内体的标记物 Rab7 被标记上 EYFP。图中显示了一个病毒颗粒（被白圈包围的红色）的快照，它先进入包含有 Rab5（青色）的早期内体。这种内体很快获得 Rab7（绿色），向晚期内体成熟。当 Rab5 和 Rab7 一旦共存时，病毒颗粒就与成熟的内体发生融合。病毒与细胞表面黏附后以秒为单位的时间在底部被显示出来（引自 Lakadamyali et al. 2006）。

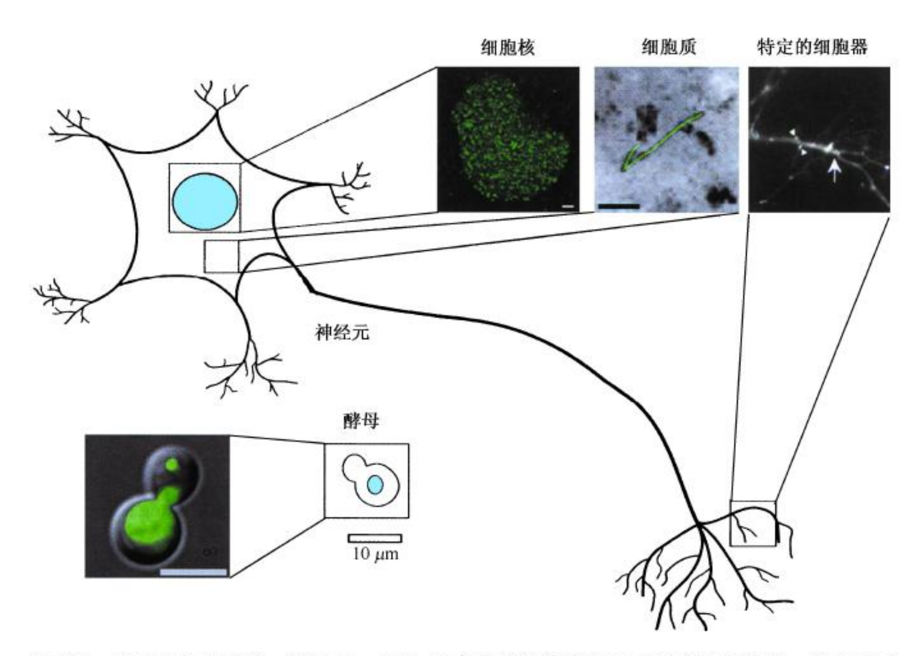



图 10-1　基因表达的成像。转录的 mRNA 从合成到被降解经历了许多调控事件。活细胞成像技术实现了对其中许多环节的动态描述。（左上图）U2OS 细胞核内单个 mRNA 粒子运动的可视化。标尺，2 μm。（摘自 Shav-Tal et al. 2004 [© American Association of the Advanced Science]）（中间上图）COS-7 细胞质中 β-肌动蛋白 mRNA 的运动。绿线显示 mRNA 粒子的轨迹。标尺，2 μm。（经允许摘自 Fusco et al. 2003 [© Elsevier]）（右上图）mRNA 粒子在神经元树突上的转运。（经允许摘自 Rook et al. 2000 [© Society for Neuroscience]）（底部图）酿酒酵母 *S. cerevisiaear* 系统中子细胞特异的 *ASH1* mRNA 在子细胞芽尖的定位。标尺，5 μm。（经允许摘自 Bertrand et al. 1998 [© Elsevier]）

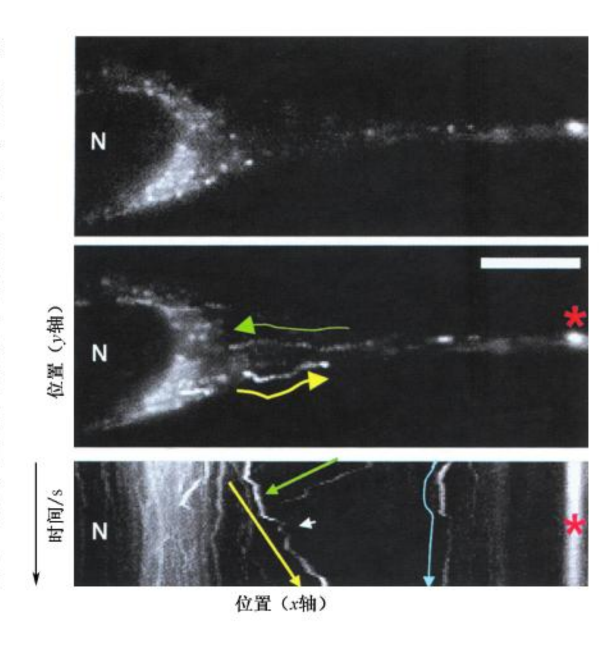



图 10-4　mRNA 粒子在共转 MCP-GFP-NLS 及 RSV-LacZ-β actin 3′UTR（报告 RNA）质粒的细胞里呈现多种动态运动。（上图）采集到的连续视频里的一幅静止的图像（参见 Wells et al. 2007）显示培养的哺乳动物成肌细胞里 MCP-GFP 与含 mRNA 的 β-肌动蛋白 3′UTR 的结合。（中图）MCP-GFP 粒子轨迹的最大强度投影（总时间 = 1 min）。箭头表示粒子运动的方向。（下图）粒子轨迹的波动曲线，y 轴为从上到下递增的时间，x 轴位置随 y 轴的时间改变。斜率特征表明粒子呈非扩散运动。（红色星号）没有速率的静止的粒子（直线）。（黄色箭头）非均一方向运动的粒子，速率为 0.15 μm/s，最大瞬间速率为 1.52 μm/s（白色箭头所示）。（绿色箭头）直线运动的粒子，平均速度为 0.45 μm/s。（蓝色箭头）粒子在一个固定的点周围闪烁，称其为“受限”（corralled）运动。N 代表细胞核，标尺长度为 10 μm。

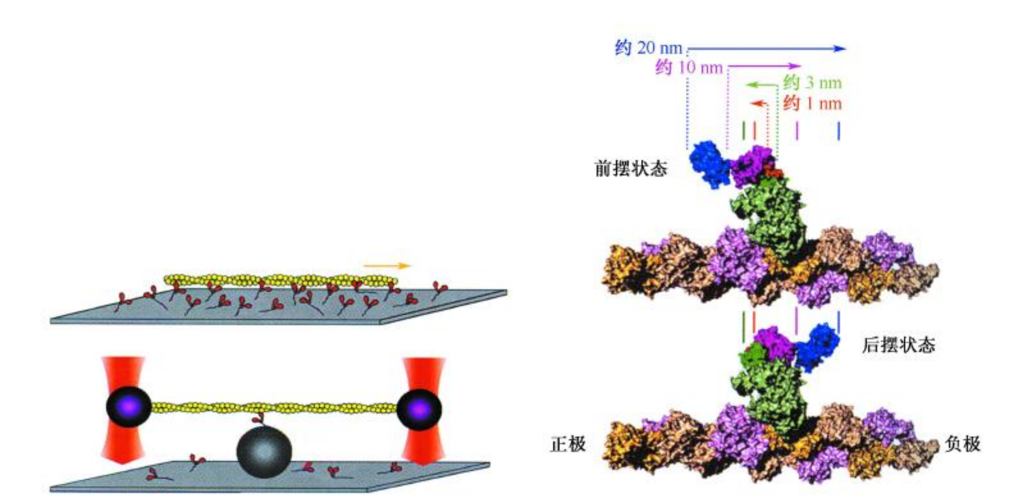



图 13-1　体外实验和肌球蛋白 VI 图示。（左图）体外运动分析技术（Kron and Spudich 1986）（上图）和单分子激光光阱技术（Finer et al. 1994）（下图）。两种技术中，肌球蛋白均被附着在盖玻片上，荧光标记的肌动蛋白纤维在肌球蛋白上移动。对于激光光阱技术，盖玻片上黏合有一层 1 μm 直径的玻璃珠，用来将肌动蛋白分子抬高，使其能够与被激光光阱抬高的肌球蛋白相互作用，激光光阱是通过 1 μm 直径的聚苯乙烯珠子结合在肌动蛋白纤维的两侧。（右图）体外运动分析技术和激光光阱技术获得的前摆状态的肌动蛋白 VI（Bryant et al. 2007）和已知的后摆状态的肌动蛋白 VI（Menetry et al. 2005）。分子马达的负极方向可以通过独特的插入和其结合的钙调蛋白（橙色和紫色区域）获得。杠杆臂上的钙调蛋白在肌动蛋白 II 和 V 中均不存在。从前摆状态到后摆状态，杠杆臂的 C 端（蓝色）向肌动蛋白纤维的负极方向移动，而转换区（绿色）同肌动蛋白 II 和 V 一样向正极方向移动。

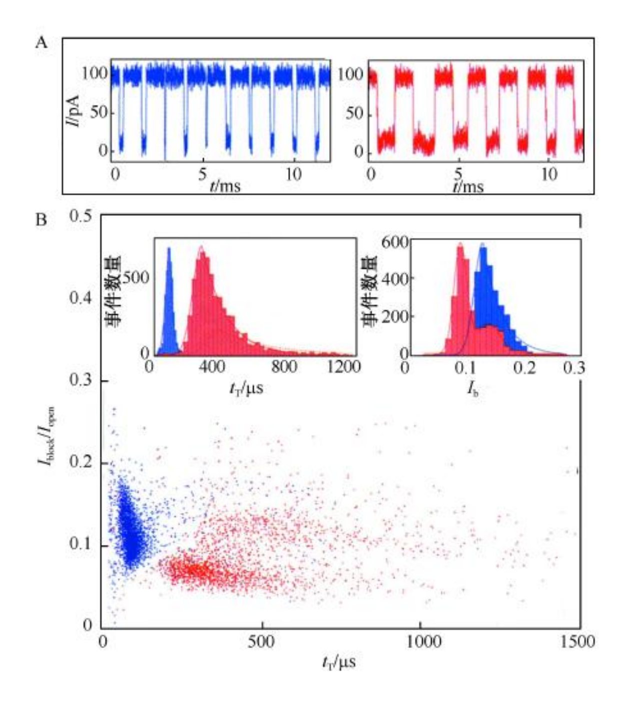



图 18-4　A. 多聚胞嘧啶（蓝色）和多聚腺嘌呤（红色）在 15℃和 120 mV 时通过 α-HL 通道的转位事件。两个同质聚合物长度都是 90 个碱基。在两个事件之间恒定的时间是因为采用了"事件"驱动的记录模式，在这个模式中，每个事件之间有一个孔开放电流的固定时间间隔。B. 将近 5000 个单分子转位事件的代表性统计分析。主图是一个事件图，其中每个数据点对应于一个单一的转位事件，纵坐标为校正阻滞电流，$I_B = I_{block}/I_{open}$，横坐标为转位时间 $t_T$。蓝点为在 20℃和 120 mV 时检测的 poly (dC)$_{100}$；红点为在 20℃和 120 mV 时检测的 poly (dA)$_{100}$；插图为 $t_T$（左）和 $I_B$（右）的柱状图。分布最可能的值（峰）分别标为 $t_p$ 和 $I_p$，用于识别转位过程。数据来源于 Meller 等 (2000)。

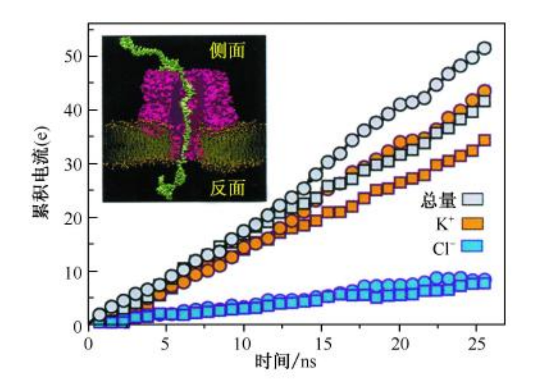



图 18-6　当 poly (dA) 分子在纳米孔中时，$K^+$ 和 $Cl^-$ 转运通过 α-HL 纳米孔的分子动态模拟结果。蓝色符号为 $Cl^-$ 对电流的贡献；橘黄色符号为 $K^+$ 对电流的贡献；灰色符号为总离子电流。做了两种情况的模拟：一个是 DNA 的 3′面向反式侧（方块），另一个是 DNA 的 5′面向反式侧（圆圈），两者的阻滞电流产生 20% 的差异（线的斜率）。这个结果与实验非常一致（Mathé et al. 2005）。

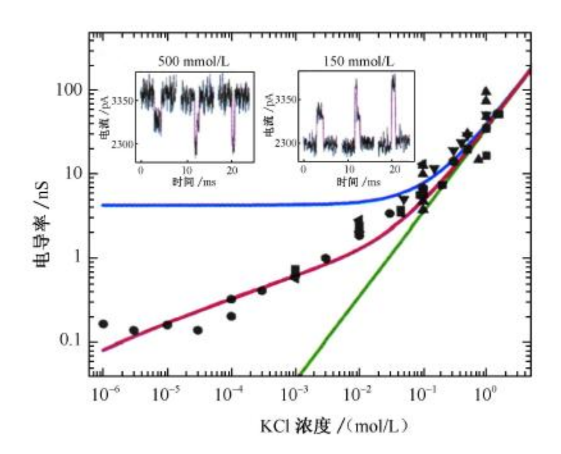



图 18-11　孔开放电流对 KCl 浓度的依赖关系，范围从 1 μmol/L 到 1 mol/L (Smeets et al. 2006)。不同的符号代表 10 个不同的纳米孔 [直径为 (10±2) nm]。绿线为一批计算的离子电流的理论计算值；蓝线为恒定的表面电荷模型；红线为变化的表面电荷模型。插图为 DNA 在两个盐浓度条件下通过 10.2 nm 孔的转位事件 (如图所示)，导致电流在降低盐浓度时从降低向增高转换。(经允许复制自 Smeets et al. 2006 [美国化学学会])